

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Speciální chemicko-biologické obory
Molekulární biologie a biochemie organismů



Michal Sýkora

Katalytická funkce DNA dependentních RNA polymeráz
Catalytic function of DNA-dependent RNA polymerases

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Václav Vopálenský, Ph.D.

Praha, 2011

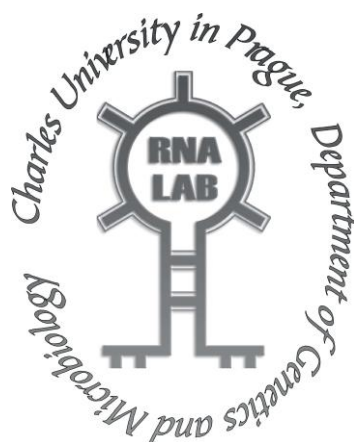
Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Lánově, 2.5. 2011

Handwritten signature of Michal Sýkora in black ink.

.....
Michal Sýkora



Poděkování:

Na tomto místě bych rád poděkoval především mému školiteli Mgr. Václavovi Vopálenskému, Ph.D. za interaktivní vedení této práce a podnětné uvedení do laboratorní praxe. Také bych rád poděkoval ostatním členům Laboratoře biochemie RNA při katedře genetiky a mikrobiologie za vytvoření příjemné atmosféry pro bádání. V neposlední řadě patří dík také mým rodičům za morální a finanční podporu mého studia.

Obsah

Abstrakt	4
Seznam použitých zkratk.....	5
1 Úvod	6
1.1 Jednopedjednotkové RNA polymerázy	7
1.2 Vícepedjednotkové RNA polymerázy.....	8
1.2.1 Bakteriální a plastidové RNA polymerázy	8
1.2.2 RNA polymerázy eukaryot a <i>Archaea</i>	8
1.2.3 RNA polymerázy nukleocytoplasmatických virů.....	10
1.2.4 Nekanonické vícepedjednotkové RNA polymerázy	11
1.3 Cíle práce.....	12
2 Transkripční cyklus ve zkratce	12
3 Funkční topologie elongačního komplexu	13
3.1 Vazebné místo pro DNA	15
3.2 Vazebné místo pro hybridní molekulu DNA:RNA.....	16
3.3 Vazebné místo pro RNA	17
4 Reakce katalyzované RNA polymerázou.....	18
5 Katalytický cyklus syntézy RNA	20
5.1 Vstup nukleotidu a jeho vazba k elongačnímu komplexu	21
5.1.1 Vstup nukleotidu sekundárním kanálem.....	21
5.1.2 Vstup nukleotidu hlavním kanálem	23
5.1.3 Vazba nukleotidu k elongačnímu komplexu	25
5.2 Inkorporace nukleotidu do řetězce RNA.....	26
5.3 Translokace.....	27
5.3.1 Model aktivní lokomoce.....	27
5.3.2 Model Brownovy rohatky.....	27
5.3.3 Alosterický model.....	29
5.3.4 Nukleotidem poháněný model	30
6 Závěr	32
Seznam použité literatury	34

Abstrakt

DNA dependentní RNA polymeráza je vysoce organizovaný proteinový komplex, který je zodpovědný za genovou expresi a její regulaci. Vícepodjednotková RNA polymeráza se svými několika katalytickými aktivitami je zodpovědná za transkripci genů do RNA kopií u všech buněčných organismů. Při transkripci podstupuje RNA polymeráza značné konformační změny v závislosti na podmínkách v konkrétní buňce. RNA polymeráza ve stavu označovaném jako elongační komplex prochází opakovanými cykly přidání nukleotidu k rostoucímu řetězci RNA. Aktivní centrum RNA polymerázy obsahuje dva hořečnaté ionty, které koordinují reaktivní skupiny substrátů. Dále aktivní centrum obsahuje strukturní prvky, jež se účastní vazby substrátu, správné orientace substrátu vůči templátovému vláknu a translokace RNA polymerázy. Nejdůležitější z těchto pohyblivých strukturních prvků jsou mostový helix a spouštěcí smyčka, jejichž konformační změny cyklus přidání nukleotidu doprovázejí. Pokroky v strukturní a biochemické charakterizaci RNA polymerázy otevírají nové možnosti v porozumění transkripčního mechanismu, jeho přesnosti a kontroly.

Klíčová slova: transkripce, vícepodjednotkové RNA polymerázy, elongační komplex, katalýza, aktivní centrum, cyklus přidání nukleotidu

Abstract

DNA-dependent RNA polymerase is a highly organised protein complex that is responsible for gene expression and its regulation. Multisubunit RNA polymerase with its several catalytic activities is responsible for transcription of genes to RNA copies in all cellular organisms. During transcription RNA polymerase undergoes substantial conformational changes depending on the conditions in a particular cell. RNA polymerase in a state designated as an elongation complex passes through repetitive cycles of adding a nucleotide to the growing RNA chain. The active center contains two magnesium ions which coordinate the reactive groups of substrates. Furthermore, the active center contains structural elements that participate in binding of substrate, proper orientation of substrate towards the template strand and translocation of the RNA polymerase. The most important of these mobile structural elements are the bridge helix and the trigger loop whose conformational changes accompanies nucleotide addition cycle. Advances in the structural and biochemical characterization of RNA polymerase open new possibilities in the understanding of the transcription mechanism, its fidelity and control.

Key words: transcription, multisubunit RNA polymerases, elongation complex, catalysis, active center, nucleotide addition cycle

Seznam použitých zkratk

List of used abbreviations

Å	Ångström (10 ⁻¹⁰ m)	Ångström (10 ⁻¹⁰ m)
aRNAP	archaeal RNA polymerase	RNA polymeráza u <i>Archaea</i>
BH	bridge helix	mostový helix
bRNAP	bacterial RNA polymerase	bakteriální RNA polymeráza
dNMP	2'-deoxyribonucleoside-5'-monophosphate	2'-deoxyribonukleosid-5'-monofosfát
dNTP	2'-deoxyribonucleoside-5'-triphosphate	2'-deoxyribonukleosid-5'-trifosfát
dsDNA	double-stranded DNA	dvouřetězcová DNA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC	elongation complex	elongační komplex
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid	kyselina ethylendiamintetraoctová
eRNAP	eukaryotic RNA polymerase	eukaryotická RNA polymeráza
FRET	fluorescence resonance energy transfer	přenos energie fluorescenční rezonancí
kDa	kilodalton (1,66 × 10 ⁻²⁴ kg)	kilodalton (1,66 × 10 ⁻²⁴ kg)
miRNA	micro RNA	mikro RNA
mRNA	messenger RNA	mediátorová RNA
NMP	ribonucleoside-5'-monophosphate	ribonukleosid-5'-monofosfát
NTP	ribonucleoside-5'-triphosphate	ribonukleosid-5'-trifosfát
ORF	open reading frame	otevřený čtecí rámec
pre-rRNA	preribosomal RNA	preribozomální RNA
pRNAP	plastid RNA polymerase	plastidová RNA polymeráza
RNAP	RNA polymerase	RNA polymeráza
rRNA	ribosomal RNA	ribozomální RNA
S	Svedberg unit (10 ⁻¹³ s)	Svedbergova jednotka (10 ⁻¹³ s)
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
siRNA	small interfering RNA	malá interferující RNA
snRNA	small nuclear RNA	malá jaderná RNA
<i>T. aquaticus</i>	<i>Thermus aquaticus</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
<i>T. thermophilus</i>	<i>Thermus thermophilus</i>	<i>Thermus thermophilus</i>
TL	trigger loop	spouštěcí smyčka
tRNA	transfer RNA	transferová RNA
vRNAP	viral RNA polymerase	virová RNA polymeráza

Použité zkratky aminokyselin

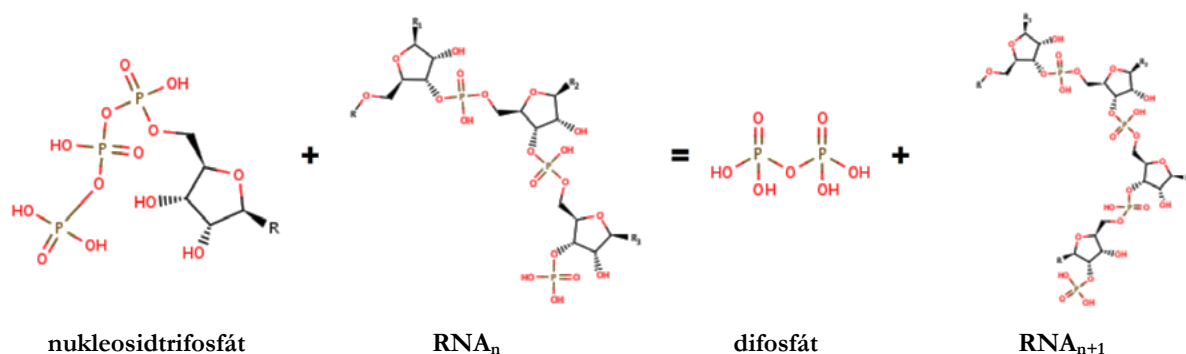
A	alanin	I	isoleucin	R	arginin
C	cystein	K	lysin	S	serin
D	aspartát	L	leucin	T	threonin
E	glutamát	M	methionin	V	valin
F	fenylalanin	N	asparagin	W	tryptofan
G	glycin	P	prolin	Y	tyrozin
H	histidin	Q	glutamin	X	jakákoliv

1 Úvod

DNA dependentní RNA polymerázy patří mezi transferázové enzymy, které katalyzují přenos fosfor obsahující nukleosidmonofosfátové skupiny na RNA (viz Obr. 1). Tyto polymerázy prodlužují 3' konec RNA řetězce po jednom nukleotidu v čase a mohou iniciovat syntézu řetězce *de novo* (Webb 1992). Vyžadují DNA templát, i když mohou posloužit i k replikaci viroidů (Rackwitz *et al.* 1981) a virusoidů (Fu a Taylor 1993), jejichž genetickým materiálem je molekula RNA. Podle enzymové nomenklatury Mezinárodní unie pro biochemii a molekulární biologii nesou označení EC 2.7.7.6 (Webb 1992).

První polymerázy tohoto typu byly nezávisle na sobě popsány v roce 1960 J. Bonnerem, J. Hurwitzem, A. Stevensem a S. Weisssem, a to v extraktech hrachu, potkaních jater a bakterie *Escherichia coli* (Kresge *et al.* 2006). Jerard Hurwitz jako první purifikoval RNA polymerázu z *E. coli* (Furth *et al.* 1962). Předtím se předpokládalo, že hlavní enzym zodpovědný za syntézu RNA je polynukleotid kináza, inkorporující nukleosiddifosfáty (Grunberg-Manago *et al.* 1955). Ta však nevyužívá žádný templát a navzdory tomu, že je schopná syntézy RNA *in vitro*, je její biologická role *in vivo* opačná (Kresge *et al.* 2006).

DNA dependentní RNA polymerázy (dále v textu již jen jako RNA polymerázy či RNAP) hrají nezastupitelnou roli v transkripci RNA. RNAP participující na transkripci, transkriptázy, se nachází ve všech buněčných organismech, kódují je i velké nukleocytoplasmatické DNA viry eukaryot čeledí *Poxviridae* (Kates a McAuslan 1967), *Asfarviridae* (Kuznar *et al.* 1980), *Iridoviridae* (Schnitzler *et al.* 1994), *Phycodnaviridae* (Wilson *et al.* 2005) a *Mimiviridae* (Raoult *et al.* 2004); dále také bakteriofágy čeledi *Podoviridae* a lineární plasmidy hub a vyšších rostlin (Kempken *et al.* 1992).



Obr. 1: Obecné schéma polymerační reakce katalyzované RNA polymerázami. Převzato z (Brenda 2011).

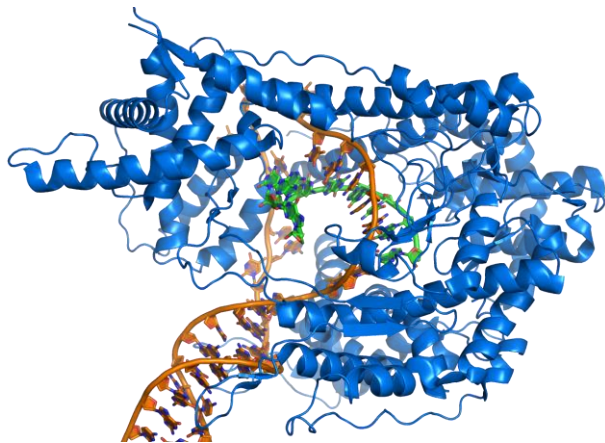
RNAP jsou také využívány při replikaci DNA, protože žádná známá DNA polymeráza nedokáže iniciovat syntézu *de novo* (Webb 1992). K tomuto účelu si buněčné i některé nebuněčné organismy kódují tzv. primázy, které syntetizují RNA primer na DNA templátu, který může být

následně prodlužován DNA polymerázou. U bakterií zastává tuto funkci protein DnaG (Rowen a Kornberg 1978) a jeho funkční analogy byly nalezeny u *Archaea*, eukaryot a také u bakteriofágů čeledi *Podoviridae* (Scherzinger *et al.* 1977), *Myoviridae* (Nossal 1980), velkých nukleocytoplasmatických DNA virů (Iyer *et al.* 2005), herpes virů (Crute *et al.* 1989) a některých DNA plasmidů bakterií (Lanka *et al.* 1979). Ne vždy je RNA primer syntetizován primázou, ale může vzniknout činností RNAP účastnící se transkripce, což se děje v mitochondriích (Xu a Clayton 1996) a některých bakteriofázích, například z čeledi *Inoviridae* (Brutlag *et al.* 1971). Nutno dodat, že primer pro DNA polymerázu může být též DNA (Bollum 1959) či protein (van der Vliet a Levine 1973). V tomto případě není výše uvedená aktivita RNAP nutná.

Transkripce, jakožto proces tvorby komplementární RNA kopie původní DNA sekvence, je první krok vedoucí k expresi genetické informace. V centru tohoto komplexního děje se nachází transkriptáza, RNAP tvořící RNA kopii genu. Z evolučního hlediska lze tyto RNAP rozdělit na 2 nepříbuzné skupiny – jednopodjednotkové a vícepodjednotkové polymerázy (Cermakian *et al.* 1997).

1.1 Jednopodjednotkové RNA polymerázy

Do první skupiny patří polymerázy bakteriofágů čeledi *Podoviridae*, například RNAP fágů SP6, T3 a T7 (McAllister 1993). Jim je sekvenčně podobná také jaderně kódovaná mitochondriální RNAP nalezena u *Saccharomyces cerevisiae* (Masters *et al.* 1987) a mnoha dalších eukaryot (Cermakian *et al.* 1996), dále jaderně kódovaná chloroplastová RNAP u vyšších fotosyntetických rostlin (Allison *et al.* 1996) a RNAP kódované některými lineárními plasmidy (Kempken *et al.* 1992). Tyto polymerázy nevykazují žádnou výraznou homologii s vícepodjednotkovými polymerázami (Cermakian *et al.* 1997). Mají strukturní doménu podobnou ruce obsahující „palec“, „dlaň“ a „prsty“, obdobnou, jako má i Klenowův fragment DNA



polymerázy I z *E. coli*. Tato doména je zodpovědná za polymeraci nukleové kyseliny podle templátu (Sousa *et al.* 1993). Celkový vzhled struktury T7 RNA polymerázy je vyobrazen na Obr. 2.

Obr. 2: Struktura T7 RNA polymerázy (modře) syntetizující RNA (zeleně) podle DNA templátu (oranžově). Založeno na PDB ID 1MSW. Převzato z (Wikipedia contributors 2011).

1.2 Vícepodjednotkové RNA polymerázy

Tato druhá a rozšířenější skupina RNA polymeráz se vyskytuje u bakterií (bRNAP), rostlinných plastidů (pRNAP), *Archaea* (aRNAP), v jádrech všech eukaryot (eRNAP I-III), v jádrech rostlin (eRNAP IV-V) a u nukleocytoplasmatických virů (vRNAP).

1.2.1 Bakteriální a plastidové RNA polymerázy

Bakteriální RNA polymeráza (bRNAP) se skládá z pěti podjednotek tvořící tzv. *core*, které je evolučně konzervované, a to co do sekvence, terciální struktury i funkce. Toto *core* je přítomné u všech buněčných organismů (Cramer *et al.* 2001; Minakhin *et al.* 2001; Sweetser *et al.* 1987; Zhang *et al.* 1999). Je složeno z velkých podjednotek β' a β , dvou podjednotek α a ω podjednotky, tvořících dohromady komplex o velikosti cca 400 kDa (Zhang *et al.* 1999). RNAP gram pozitivních bakterií obsahuje dvě různé ω podjednotky a navíc δ podjednotku (Achberger a Whiteley 1980). U bakterií rodu *Helicobacter* a jim příbuzných bakterií došlo k fúzi β' a β podjednotek (Zakharova *et al.* 1999). *Core* samo o sobě není schopno zahájit transkripci tak, aby umožnilo specifický přepis cílové sekvence. K tomu je vyžadována σ podjednotka (Burgess *et al.* 1969; Travers a Burgess 1969), jež může být zastoupena v bakterii pouze v jedné formě, jako u mykoplasm (Himmelreich *et al.* 1996), nebo může být v buňce několik forem σ podjednotek, třeba téměř 60, jak tomu je u *Streptomyces coelicolor* (Hahn *et al.* 2003). Bakteriální typ RNAP se mimo bakterií dá najít třeba také v mitochondriích prvoka *Reclinomonas americana* (Lang *et al.* 1997).

Plastidová RNA polymeráza (pRNAP) je organizována podobně jako bRNAP kmene *Cyanobacteria*. *Core* této bRNAP a pRNAP obsahuje β' podjednotku, β'' podjednotku, dvě α podjednotky, ω podjednotku a je kódováno plastidovým genomem. β' a β'' podjednotky jsou obě ekvivalentní bakteriální β' podjednotce (Hajdukiewicz *et al.* 1997). Sigma podjednotky jsou jaderně kódovány (Hajdukiewicz *et al.* 1997). U mechů došlo k relokizaci genu kódujícího α podjednotku pRNAP do jádra (Sugiura *et al.* 2003). Kromě organel lze nalézt pRNAP kódovanou třeba v kruhovém DNA plasmidu některých parazitů rodu *Plasmodium* (Howe 1992).

1.2.2 RNA polymerázy eukaryot a *Archaea*

Eukaryotní, jaderně kódované, RNA polymerázy jsou zodpovědné za syntézu RNA molekul rozličných funkcí. eRNAP I syntetizuje pre-rRNA, která maturuje v rRNA obsaženou v ribozomech, eRNAP II syntetizuje hlavně prekursor mRNA, většinu snRNA a miRNA, eRNAP III syntetizuje tRNA, 5S RNA a řadu malých RNA. Geny pro eRNAP IV byly nalezeny

u vyšších rostlin (*Embryobionta*) a jim příbuzných zelených řas řádu *Charales* skupiny *Charophyta* (Luo a Hall 2007). eRNAP IV syntetizuje 24 nukleotidovou siRNA, podílející se na umlčování endogenní DNA (Herr *et al.* 2005). eRNAP V je specifická pro krytosemenné rostliny (*Magnoliophyta*) (Marcussen *et al.* 2010) a její siRNA transkripty řídí tvorbu heterochromatinu (Wierzbicki *et al.* 2009). Každá z eRNAP I-III obsahuje unikátní ortholog β' a β'' podjednotky, dvou α podjednotek a ortholog ω podjednotky. Tyto tři RNAP obsahují navíc dalších 7 podjednotek, a to některých sdílených těmito eRNAP a některých unikátních pro každou z nich. Core eukaryotických RNA polymeráz je tvořeno 12 podjednotkami (Landick 2009). Eukaryotní RNAP I má navíc dvě unikátní podjednotky a eRNAP III pět unikátních podjednotek. Sekvence podjednotek eRNAP IV a eRNAP V naznačuje podobnost těchto RNAP s eRNAP II (Ream *et al.* 2009).

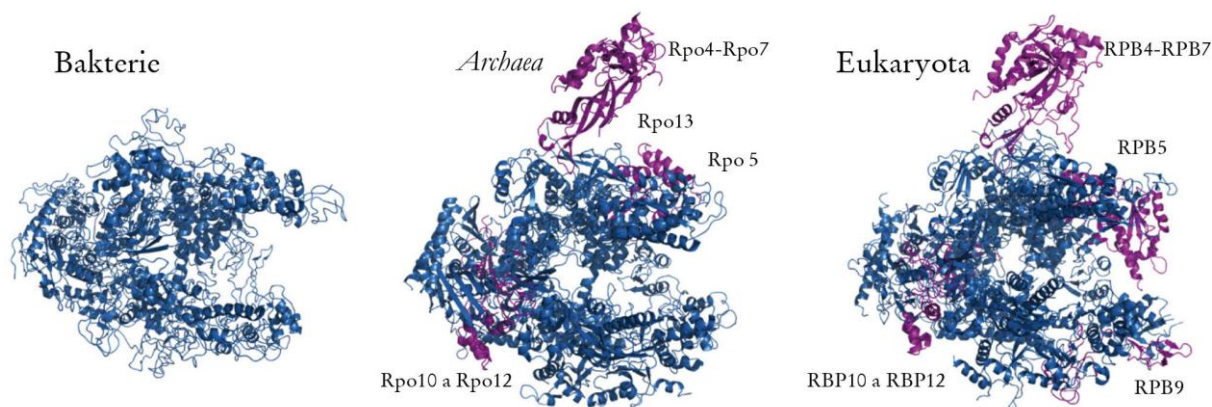
Archaea kódují jedinou RNA polymerázu (aRNAP), která obsahuje až 12 podjednotek, přičemž 11 z nich vykazuje sekvenční i strukturní homologii ke *core* eRNAP, což naznačuje funkční diverzifikaci eRNAP z *Archaea* (Ream *et al.* 2009). Tak jako bRNAP a pRNAP vyžadují pro transkripci σ podjednotku, aRNAP, eRNAP a vRNAP vyžadují tzv. obecné transkripční faktory. Přehled jednotlivých podjednotek u buněčných organismů je uveden v Tabulce 1, struktura pětičetného *core* a přídatných podjednotek je zobrazena na Obr. 3.

Tabulka 1: Podjednotky RNAP u buněčných organismů. Upraveno podle (Werner a Grohmann 2011).

Bakterie	<i>Archaea</i>	Eukaryota				
bRNAP	aRNAP	eRNAP I	eRNAP II	eRNAP III	eRNAP IV	eRNAP V
β'	Rpo1N (RpoA') + Rpo1C (RpoA'')	A190	RPB1	C160	NRPD1	NRPE1
β	Rpo2 (RpoB)	A135	RPB2	C128	NRPD/E2	NRPD/E2
α	Rpo3 (RpoC)	AC40	RPB3	AC40	RPB3 [1]	RPB3 [1]
α	Rpo11 (RpoL)	AC19	RPB11	AC19	RPB11	RPB11
ω	Rpo6 (RpoK)	RPB6	RPB6	RPB6	RPB6 [1]	RPB6 [1]
	Rpo5 (RpoH)	RPB5	RPB5	RPB5	RPB5 [3]	NRPE5
	Rpo8 § (RpoG)	RPB8	RPB8	RPB8	RPB8 [1]	RPB8 [1]
	Rpo10 (RpoN)	RPB10	RPB10	RPB10	RPB10	RPB10
	Rpo12 (RpoP)	RPB12	RPB12	RPB12	RPB12	RPB12
	Rpo4 (RpoF)	A14	RPB4	C17	NRPD/E4	NRPD/E4
	Rpo7 (RpoE)	A43	RPB7	C25	NRPD7 [1]	NRPE7
		A12	RPB9	C11	NRPD9b	RPB9
	Rpo13 §					
		A49, A34		C53, C37		
				C34, C31, C82		

* řádky udávají orthology *core* podjednotek; čísla v hranatých závorkách uvádějí počet orthologů eRNAP IV a eRNAP V podjednotek

§ podjednotky nalezené u některých, ale ne u všech *Archaea*; šedě označeny další podjednotky specifické pro eRNAP I a eRNAP III



Obr. 3: Horní pohled na strukturu RNAP u tří buněčných větví života, modře znázorněno evolučně konzervované *core* pěti podjednotek, fialově přidatné podjednotky u aRNAP a eRNAP II. Založeno na PDB ID 1I6V (bRNAP), 2WAQ (aRNAP) a 1NT9 (eRNAP II). Upraveno podle (Werner a Grohmann 2011).

1.2.3 RNA polymerázy nukleocytoplasmatických virů

U všech čeledí nukleocytoplasmatických velkých dsDNA virů byly nalezeny minimálně tři (RPB1, RPB2 a RPB5) homology eRNAP, přičemž u některých čeledí byly nalezeny ještě homology dalších podjednotek (shrnuť v Tabulce 2). Tyto geny byly patrně získány od eukaryotických hostitelů (Iyer *et al.* 2006). Na základě srovnání sekvencí velkých podjednotek RNAP těchto virů, aRNAP a eRNAP I-III byla určena jejich fylogenetická příbuznost (viz Obr. 4). Poxviry kódují polymerázu podobnou eRNAP I a *Phycodnaviridae*, *Mimiviridae* a *Iridoviridae* kódují polymerázu podobnou eRNAP II (Lane a Darst 2010). *Asfarviridae* byly z analýzy vyloučeny díky vysoké divergenci sekvencí jejich podjednotek RNAP (Lane a Darst 2010).

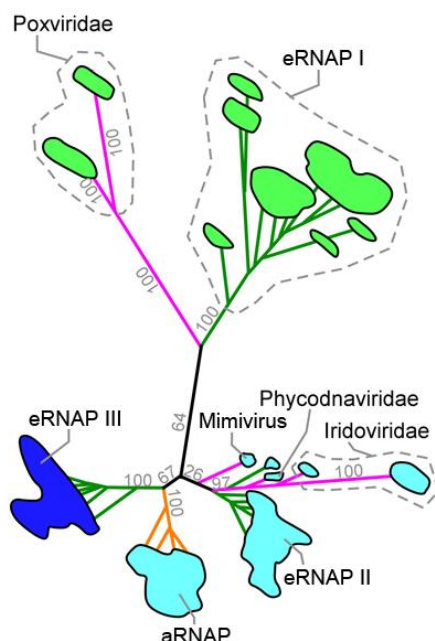
Tabulka 2: Podjednotky RNAP u nukleocytoplasmatických virů homologické k eRNAP.

eRNAP II	RPB1	RPB2	RPB3	RPB11	RPB6	RPB5	RPB8	RPB10	RPB12	RPB4	RPB7	RPB9
VV	RPO1	RPO2	+			RPO22		RPO7				RPO30
ASFV	+	+	+		+	+		+				
ApMV	+	+	+		+	+						
EhV	+	+			+	+	+	+				
<i>Iridoviridae</i>	+	+				+						

* VV - Virus vakcinie (*Poxviridae*), ASFV - Virus africké prasečí horečky (*Asfarviridae*), ApMV - *Acanthamoeba polyphaga* mimivirus (*Mimiviridae*), EhV - *Emiliana huxleyi* virus (*Phycodnaviridae*); + označuje predikované podjednotky

Upraveno podle (Ruprich-Robert a Thuriaux 2010).

Všechny výše uvedené vícepodjednotkové RNAP obsahují homologní oblast aktivního centra o velikosti cca 500 aminokyselin a patří spolu s jednopodjednotkovými eukaryotickými RNA dependentními RNA polymerázami zapojenými v umlčování genové exprese do monofyletické rodiny RNAP (Iyer *et al.* 2003). Tyto RNA dependentní RNAP obsahují



univerzálně konzervovaný motiv β' podjednotky, který váže hořčnatý iont, blíže viz kapitola 4 (Iyer *et al.* 2003).

Obr. 4: Fylogenetický strom příbuznosti sekvencí aminokyselin velkých podjednotek RNAP vybraných virových čeledí zhotovený na základě srovnání sekvencí velkých podjednotek. Zelené větve přiřazeny eRNAP, oranžové aRNAP a růžové vRNAP. Upraveno podle (Lane a Darst 2010).

1.2.4 Nekanonické vícepodjednotkové RNA polymerázy

Kromě již uvedených vícepodjednotkových RNAP existují ještě tzv. nekanonické RNAP, patřící do stejné rodiny, ale obsahující menší oblast homologie s dosud zmíněnými vícepodjednotkovými RNAP (Ruprich-Robert a Thuriaux 2010). Do této skupiny patří predikované RNAP kódované cytoplasmickými lineárními dsDNA plasmidy kvasinek *Kluyveromyces lactis* (Wilson a Meacock 1988), *Saccharomyces kluyveri* (Hishinuma a Hirai 1991), *Pichia acaciae* (Worsham a Bolen 1990) a dle hybridizačních experimentů zřejmě i plasmidy kvasinek *Pichia etchellsii*, *Debaromyces hansenii* a *Wingea robertsiae* (Cong *et al.* 1994). Sekvence ORF6 plasmidu pGKL2 u *Kluyveromyces lactis* kóduje protein sekvenčně podobný fúzi RPB1 podjednotky s RPB2 podjednotkou nebo paralogů těchto podjednotek u eRNAP I či eRNAP III (Wilson a Meacock 1988). Tento protein se s mým školitelem snažíme biochemickými a molekulárně biologickými metodami charakterizovat, což by měl být jeden z cílů mé diplomové práce.

Další netradiční vícepodjednotková RNAP byla nalezena u virů *Baculoviridae* (Guarino *et al.* 1998) a *Nudiviridae* (Wang a Jehle 2009). U bakulovirů se skládá z podjednotek p47, LEF-4, LEF-8 a LEF-9 a přepisuje pozdní a velmi pozdní geny (Guarino *et al.* 1998). Pouze podjednotky LEF-9 a LEF-8 vykazují nepříliš výraznou homologii k podjednotkám RPB1 a RPB2. Nudiviry, jakožto sesterská skupina bakulovirů, kódují čtyři podjednotky se slabou homologií k bakulovirovým podjednotkám RNAP (Wang a Jehle 2009). Podjednotky LEF-9 a LEF-8 nejspíše pochází z eukaryotických genů kodujících podjednotky RPB1 a RPB2 (nebo jejich ekvivalentů eRNAP I a III) a prodělaly rychlou a divergentní evoluci (Ruprich-Robert a Thuriaux 2010).

Nekanonické RNAP mají také relativně nedávno sekvenované fágy ϕ EL a ϕ KZ180 u *Pseudomonas aeruginosa* a 201 ϕ 2 u *Pseudomonas chlororaphis*. Všechny tři fágy kódují dva proteiny vzdáleně příbuzné β' a β podjednotkám (Hertveldt *et al.* 2005; Thomas *et al.* 2008). Všechny vícepodjednotkové RNAP ale spojuje invariantní sekvence osmi aminokyselin obsahující NADFDGD motiv katalytického místa, kde konzervované aspartáty váží jeden ze dvou hořčnatých iontů potřebných pro přidání nukleotidu, blíže viz kapitola 4 (Zaychikov *et al.* 1996).

1.3 Cíle práce

Tato práce si klade za cíl popsat mechanismus katalýzy NTP v aktivním centru vícepodjednotkových RNA polymeráz. Toto téma úzce souvisí s pravděpodobnou náplní mojí diplomové práce, což by měla být charakterizace *in silico* předpovězené RNAP u plasmidu pGKL2 kvasinky *Kluyveromyces lactis*. Tato RNA polymeráza je zajímavá z několika důvodů, které jsou uvedeny v závěru této práce. Mechanismus katalýzy a elongace RNA bude demonstrován převážně na modelu bRNAP a kvasinkové eRNAP II, protože u těchto RNAP jsou nejdéle dostupné krystalografické struktury ve vysokém rozlišení. Konkrétně se jedná o bRNAP *Thermus aquaticus* v rozlišení 3,3 Å z roku 1999 (Zhang *et al.* 1999), eRNAP II *Saccharomyces cerevisiae* v rozlišení 3,1 Å z roku 2000 (Cramer *et al.* 2000) a v rozlišení 2,8 Å z roku 2001 (Cramer *et al.* 2001). Většina prací prekrystalografické éry se zabývala bRNAP *E. coli*. Projekce nepřímými metodami takto získaných dat v těchto pracích na prostorové struktury získané krystalografií otevřela nové příležitosti pro strukturně-funkční studie.

2 Transkripční cyklus ve zkratce

Transkripce je vysoce regulovaný cyklický proces, který se dá rozdělit na tři víceméně samostatné fáze: iniciaci, elongaci a terminaci. Při iniciaci transkripce dochází k vazbě RNAP na promotorovou oblast. Specifitu k promotorové sekvenci bRNAP udílí σ podjednotka, která tvoří s pětipodjednotkovým *core* tzv. holoenzym RNAP (Gross *et al.* 1998). U eRNAP II tuto funkci zastávají obecné transkripční faktory. Poté následuje u bRNAP i eRNAP II tvorba uzavřeného preiniciačního komplexu na promotoru, následně dochází k rozvolnění dvoušroubovicové struktury DNA v oblasti transkripčního startu a tvorbě otevřeného komplexu, který již může iniciovat syntézu RNA vlákna. Následuje i několikrát opakovaná abortivní iniciace¹, kdy jsou tvořeny a uvolňovány krátké RNA fragmenty. Posun od iniciace k elongaci je

¹ Abortivní iniciace byla zatím *in vivo* prokázána jen u bakterií (Goldman *et al.* 2009).

znám jako tzv. únik z promotoru, jenž u bRNAP může ale nemusí být spojen s uvolněním σ podjednotky (Bar-Nahum a Nudler 2001) a u eRNAP II je spojen s uvolněním většiny obecných transkripčních faktorů (Pokholok *et al.* 2002). Únik bRNAP zahrnuje i chrupot² DNA, při němž RNAP zůstává nehybná a rozplétá a vtahuje do sebe DNA po směru transkripce, což může být hnací silou pro abortivní iniciaci či únik z promotoru (Revyakin *et al.* 2006). S únikem eRNAP II je mimo jiné spjata hyperfosforylace serinů 2 a 5 opakujícího se YSPTSPS motivu C-terminální domény největší podjednotky *core* RPB1 [pro přehled viz (Buratowski 2009)]. Následuje fáze procesivní elongace, kdy enzym, nyní ve stavu označovaném jako elongační komplex (EC), prodlužuje předtím vzniklý oligonukleotid. Termíny označující různé stavy EC, které se mohou dále v textu objevit, jsou uvedeny v Boxu 1. Fáze elongace končí, když EC oddisociuje od DNA v reakci na terminační signál. Volný enzym může znova vstoupit do iniciační fáze transkripce.

Box 1: Termíny označující různé stavy elongačního komplexu.

- Pozastavený: EC, který zastavil transkripci, ale zůstal transkripce schopný a předpokládá se, že v ní bude pokračovat. Pozastavení ale také může být prekurzorem terminace.
- Vrácený: EC, který zastavil syntézu a posunul se zpátky po DNA templátu o jeden či více nukleotidů, čímž se posunul 3' konec nascentního RNA vlákna z aktivního centra. Podmnožina těchto komplexů se aretuje a bez přítomnosti dalších faktorů indukujících štěpení nemůže spontánně obnovit transkripci. Utvoření nového 3' konce RNA řádně sladěného s aktivním centrem povolí obnovení transkripce. Takto „zachráněné“ EC se však před obnovením syntézy mohou pozastavit.
- Zabrzděný: Široký pojem odkazující na EC, které zastavily RNA syntézu, ale nedá se u nich usuzovat na transkripční stav polymerázy. Termín tedy zahrnuje komplexy pozastavené, vrácené, aretované a ty, v nichž probíhá terminace. Zabrzděné komplexy jdou také uměle připravit *in vitro* deplecí ribonukleotidů.

Upraveno podle (Nechaev a Adelman 2011).

3 Funkční topologie elongačního komplexu

Strukturně připomíná *core* RNAP krabí klepeto, kdy jeden „prst“ je tvořen β' podjednotkou a druhý β podjednotkou. Mezi nimi se nachází cca 27 Å široký hlavní kanál, jehož stěny váží DNA po směru transkripce a hybridní molekulu DNA:RNA při elongaci (Zhang

² V originále *scrunching*.

a

DNA proti směru transkripce

RNA kanál

zip

svorka

hlava svorky

patka

vičko

kormidlo

BH

FL2

TL

Mg-A

pór

čelist

trychtýř

sekundární kanál

směr transkripce

b

boční pohled

c

Rpb4/7

core

horní pohled

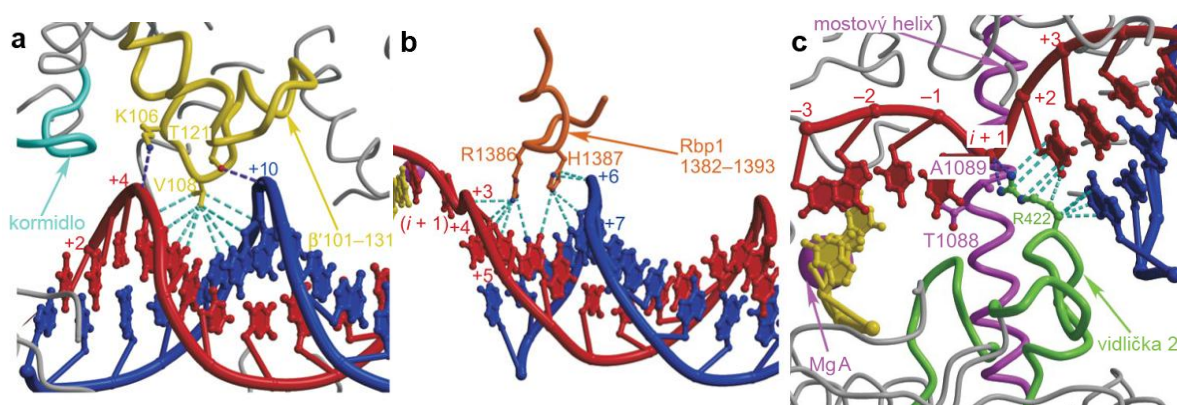
legenda:

- templátová DNA
- netemplátová DNA
- produkovaná RNA
- modelovaná B-DNA

14

3.1 Vazebné místo pro DNA

Vazebné místo pro DNA interaguje zhruba s devíti páry bází dvoušroubovice DNA po směru transkripce v bezprostřední blízkosti katalytického centra (Korzheva *et al.* 2000). DNA je směřována hlavním kanálem mezi svorkovou a čelistní doménou β' podjednotky a $\beta 1$ doménou β podjednotky. Zachovává si svou B konformaci až do pozice +2 (počítáno od +1 NTP vazebného místa) u *Thermus thermophilus* (Vassilyev *et al.* 2007a) a +4 u *S. cerevisiae* (Gnatt *et al.* 2001), kde se láme pod úhlem zhruba 90° vlivem „přepínačových“ domén β' podjednotky. Spolu s působením vidličkovité smyčky 2 podjednotky β zde dochází k oddělení obou vláken DNA. Vidličková smyčka 2 je zodpovědná za udržování konstantní velikosti transkripční bubliny po směru transkripce, protože funguje jako sterická bariéra průniku dvouřetězcové DNA (dsDNA) do aktivního místa. U *T. thermophilus* tvoří na špičce vidličkové smyčky 2 R422 β podjednotky vodíkovou vazbu s fosfátem akceptorové templátové báze a *stacking* interakce s +2 párem bází (viz Obr. 6c) (Vassilyev *et al.* 2007a). U *S. cerevisiae* má podobnou funkci R504 a K507, vidličková smyčka 2 však v některých zjištěných komplexech zaujímá jinou konformaci a ruší nukleotidový pár na pozici +5, kde dochází k separaci vláken DNA (Wang *et al.* 2006).



Obr. 6: (a) Proteinové segmenty zanořené v malém žlábků EC bRNAP *T. thermophilus* a (b) EC eRNAP II *S. cerevisiae*. (c) Interakce vidličkové smyčky 2 u *T. thermophilus*. Templátové vlákno DNA zobrazeno červeně, netemplátové vlákno modře, RNA žlutě, van der Waalovy interakce tyrkysově a polární interakce purpurově. Upraveno podle (Vassilyev *et al.* 2007a).

RNAP interaguje s dsDNA skrz van der Waalovy a elektrostatické interakce, což umožňuje dobrou mobilitu DNA a tím i vysokou procesivitu elongace. Interakce jsou nejsilnější mezi +2 a +5 oblastí, kde pravděpodobně stabilizují lom dsDNA a pomáhají správně orientovat akceptorovou templátovou bázi do aktivního místa (Vassilyev *et al.* 2007a). Zvláště pozoruhodný je tříhelixový svazek β' podjednotky, který tvoří několik polárních a van der Waalových interakcí s fosfáty dsDNA. U *T. thermophilus* je V108 podjednotky β' , nacházející se mezi prvním a druhým helixem, orientován do malého žlábků a může bránit „prokluzování“ nukleové kyseliny při

indukci vývrtkovitého pohybu během DNA translokace (viz Obr. 6a). U eRNAP II *S. cerevisiae* zastávají stejnou funkci R1386 a H1387 C-terminální svorkové domény podjednotky Rpb1 (viz Obr. 6b) (Vassilyev *et al.* 2007a).

3.2 Vazebné místo pro hybridní molekulu DNA:RNA

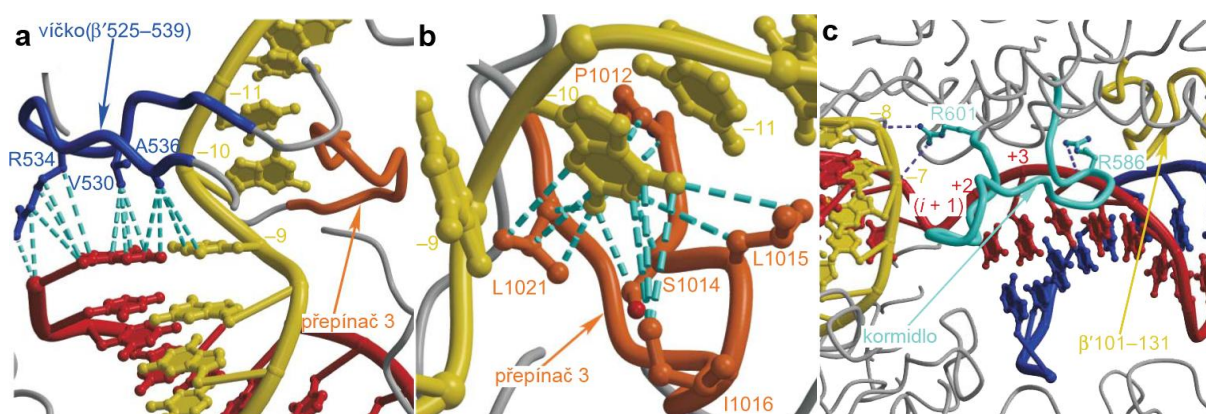
Toto místo se nachází hluboko v hlavním kanálu mezi svorkovou doménou β' podjednotky a β_1 a β_2 doménou β podjednotky. Dochází v něm k vazbě cca osmi až devíti párů bází hybridní molekuly DNA:RNA uvnitř cca 12 až 15 nukleotidů dlouhé transkripční bubliny (Nudler *et al.* 1997). Po směru transkripce je ohraničeno mostovým helixem (BH) β' (Rpb1) podjednotky a proti směru transkripce je ohraničeno víčkovou doménou β' podjednotky (Korzheva *et al.* 2000).

Fosfátová páteř hybridní molekuly DNA:RNA tvoří mnoho polárních a van der Waalsových interakcí s konzervovanými proteinovými zbytky, přičemž van der Waalsovy interakce mají pravděpodobně dvě zásadní role. Zaprvé odpuzování hydrofobních postranních řetězců a nabitých fosfátových skupin může oslabit vodíkové vazby, které se druhotně tvoří s bazickými zbytky aminokyselin, čímž se předejde příliš silnému navázání nukleové kyseliny, jež by mělo za následek sníženou procesivitu elongace (Vassilyev *et al.* 2007a). Zadruhé mohou působit jako senzor tvaru, který monitoruje konfiguraci hybridu DNA:RNA k poskytnutí zpětné vazby při neshodném párování nebo nesprávném začlenění dNMP, čímž by přispívaly k transkripční přesnosti (Vassilyev *et al.* 2007a).

V případě, že dochází k „návratu“ EC, funguje mostový helix jako zámek zipu po směru transkripce, o který se hybrid DNA:RNA rozplétá, 3' konec nascentní RNA je vysouván do sekundárního kanálu (Wang *et al.* 2009). Jako zámek zipu proti směru transkripce (pozice -9) funguje hlavně víčková smyčka β' podjednotky, která jako klín usnadňuje dislokaci RNA z hybridu DNA:RNA, přičemž interaguje s 5' koncovým nukleotidem syntetizované RNA i s jeho komplementární bází v DNA (Obr. 7a), napodobujíc *stacking* interakce a znemožňujíc tak sterickým blokováním tvorbu příliš dlouhé hybridní molekuly DNA:RNA (Westover *et al.* 2004b). Vzhledem ke flexibilitě víčkové domény může kolísat celková délka hybridu DNA:RNA mezi sedmi až deseti páry bází (Nudler *et al.* 1997), což může stabilizovat různé nestandardní konfigurační hybridu vznikající během pozastavení EC, vracení EC a terminaci transkripce (Vassilyev *et al.* 2007a). Na jednovláknových templátech transkribovaných RNAP s deletovanou víčkovou doménou zůstává RNA spojena s DNA po celé délce, nicméně na dsDNA templátech takový vliv pozorován nebyl, což značí, že pro dislokaci RNA je esenciální zpětné převinutí DNA

(Naryshkina *et al.* 2006). V tomto ohledu je zajímavá smyčka „přepínače“ 3 podjednotky β , která interaguje s první dislokovanou bází RNA (Obr. 7b), což může při předpokládané kompetici o templátové vlákno mezi netemplátovým vláknem a RNA hrát zásadní roli (Vassylyev *et al.* 2007a).

Další doména podílející se na stabilizaci hybridu DNA:RNA je „kormidlo“ β' podjednotky, které spojuje konec hybridu DNA:RNA proti směru transkripce s dsDNA po směru transkripce a ačkoliv je nepravděpodobné, že by se podílelo na separaci vláken hybridu DNA:RNA, přispívá k celkové stabilitě transkripčního komplexu (Kuznedelov *et al.* 2002). Přímý kontakt „kormidlových“ zbytků R586 podjednotky β' s fosfáty DNA a R601 podjednotky β' s fosfáty hybridu DNA:RNA u *T. thermophilus* vymezuje jejich vzájemné polohy (viz Obr. 7c). Ke stabilizaci hybridní molekuly DNA:RNA může ještě sloužit vidličková smyčka 1 β podjednotky, která reaguje s fosfáty RNA na pozici -5 až -7 a může předcházet rozvíjení hybridu DNA:RNA před -7 až -8 pozicí. Víčková smyčka, „kormidlo“ a vidličková smyčka 1 neinteragují pouze s nukleovými kyselinami, ale také mezi sebou (Westover *et al.* 2004b).

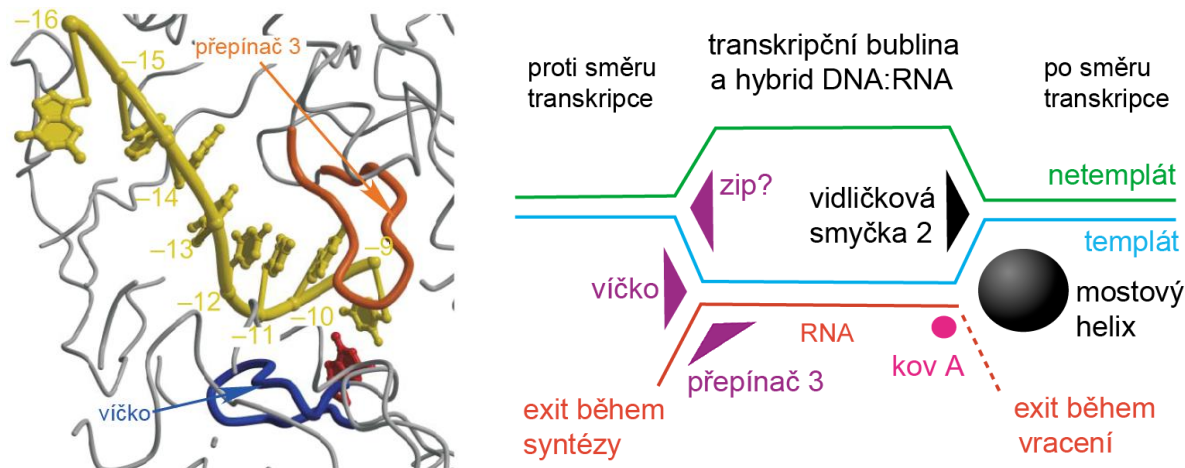


Obr. 7: Některé domény RNAP *T. thermophilus* (a) Víčková smyčka tvořící *stacking* interakce s posledním párem hybridu DNA:RNA. (b) „Přepínač“ 3 interagující s první dislokovanou RNA bází. (c) „Kormidlo“ spojující hybrid s DNA po směru transkripce. Barevné značení jako na Obr. 6. Upraveno podle (Vassylyev *et al.* 2007a).

3.3 Vazebné místo pro RNA

U elongačního komplexu *T. thermophilus* i *S. cerevisiae* je nascentní transkript oddělen od hybridu DNA:RNA v pozici -8 až -10 a pak je směřován pórem tvořeným víčkovou doménou a sedlovou doménou β' podjednotky do odchodného kanálu RNA, tvořeného převážně patkovou doménou β podjednotky. Mezi RNA a RNAP je v odchodném kanálu vytvořeno pouze pár přímých a několik vodou zprostředkovaných interakcí, takže A konformace, kterou jednovláknová RNA v kanálu zaujme, je nejspíš zapříčiněna hlavně samostabilizujícími *stacking* interakcemi bází nebo interakcemi zprostředkovanými rozpouštějícím prostředím. Několik kyselých postranních řetězců a kyslíků karbonylu hlavních řetězců aminokyselin se přibližuje

páteři RNA, což značí možnou účast Mg^{2+} iontů jako mediátorů těchto interakcí (Vassilyev *et al.* 2007a). K celkové stabilitě EC však přispívají jen interakce proteinu a RNA mezi pozicí -8 až -10, takže RNA vazebné místo je definováno jen jako tato oblast (Sidorenkov *et al.* 1998). RNA v odchodném kanálu je vyobrazena na Obr. 8 spolu se schématem transkripční bubliny.



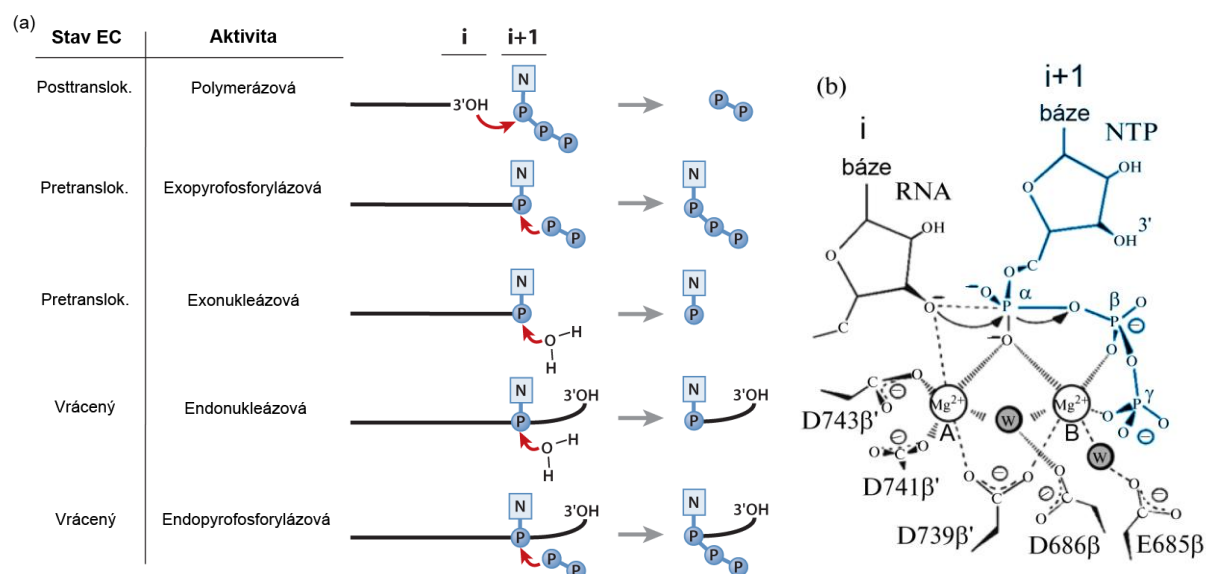
Obr. 8: Vlevo dislokovaná RNA (žlutě) z hybridu DNA:RNA v RNA odchodném kanálu RNAP *T. thermophilus*. Upraveno podle (Vassilyev *et al.* 2007a). Vpravo schéma transkripční bubliny a domén podílejících se na jejím udržování. Upraveno podle (Cramer 2002).

4 Reakce katalyzované RNA polymerázou

Ačkoliv polymerace je hlavní enzymatickou aktivitou RNAP, není to aktivita jediná. Všechny reakce však probíhají v jednom aktivním centru, které obsahuje dvě místa vázající substrát, jmenovitě i místo a $i+1^3$ místo (Zhang *et al.* 1999). Všechny reakce také vyžadují v aktivním centru přítomnost dvou Mg^{2+} iontů, které stabilizují trigonálně bipyramidální přechodový stav a probíhají bimolekulárním nukleofilním substitučním mechanismem (S_N2), kdy je mezi donorem a akceptorem přenášén ribonukleosid-3'-monofosfát (NMP), ať už samostatný nebo jako součást 3' konce RNA vlákna (Sosunov *et al.* 2003). Jeden Mg^{2+} iont (Mg-A) je vázán třemi aspartátovými zbytky konzervovanými v NADFDGD motivu β' (Rpb1) podjednotky, konkrétně se jedná o zbytky D739, D741 a D743 u *T. thermophilus* (Vassilyev *et al.* 2002). Druhý Mg^{2+} iont (Mg-B) se nachází cca 4 Å od Mg-A, interaguje s aspartátem D739 z výše uvedeného motivu a nepřímo přes vodou zprostředkované interakce se zbytky E685 a D686 β (Rpb2) podjednotky (viz Obr. 9b) (Vassilyev *et al.* 2007b). Zatímco Mg-A je ve vícepodjednotkových RNAP přítomen neustále, Mg-B je do aktivního centra vždy znova přinesen dalším nukleotidem a opouští RNAP spolu s pyrofosfátem, což odlišuje vícepodjednotkové od jednopodjednotkových RNAP, u kterých vždy oba Mg^{2+} ionty přichází spolu se substrátem

³ $i+1$ místo je někdy označováno jako A místo nebo také elongační místo.

(Westover *et al.* 2004a). Mechanismus využívání dvou kovových iontů je univerzální u všech rodin polynukleotidových polymeráz (Steitz 1998). V závislosti na substrátech, které se v daných místech zrovna nachází, může probíhat jedna z reakcí znázorněných na Obr. 9a.



Obr. 9: (a) Enzymatické aktivity RNAP. Čáry znázorňují RNA, P znázorňuje fosfátové skupiny, N znázorňuje nukleosidový zbytek, červená šipka označuje směr nukleofilního útoku, i a $i+1$ reprezentují místa aktivního centra. Upraveno podle (Nudler 2009). (b) Mechanismus přidání nukleotidu. Zobrazen 3' konec RNA vlákna, přicházející nukleotid (modře), aminokyselinové zbytky vážící Mg-A a Mg-B, W značí molekulu vody. Číslování podle RNAP *T. thermophilus*. Upraveno podle (Sosunov *et al.* 2003).

Polymerační reakce

Během syntézy je i místo obsazené 3' koncem transkriptu a ribonukleotid-5'-trifosfát (NTP) se váže do $i+1$ místa. Tento stav EC se nazývá posttranslokovaný. Po přidání NMP k rostoucímu transkriptu je $i+1$ místo obsazené 3' koncem RNA. Tento stav EC se nazývá pretranslokovaný. Aby se umožnilo navázání dalšího nukleotidu, tak se musí RNAP posunout po DNA templátu o jeden nukleotid, a tím se dostane opět do posttranslokovaného stavu. Během elongace se EC vyskytuje v rovnováze mezi i a $i+1$ stavem (Brueckner a Cramer 2008). Podrobněji je o polymeraci pojednáno v kapitole 5.2.

Exopyrofosforolýza

RNAP je schopna také pyrofosforolýzy (Rozovskaya *et al.* 1981). Exopyrofosforolýza je přesným opakem polymerační reakce. NMP je přenesen z 3' konce RNA vlákna, které se nachází v $i+1$ místě (EC je tedy pretranslokovaný), na pyrofosfát. Při pyrofosforolýze koordinuje Mg-B atakující pyrofosfát a cílovou fosfátovou skupinu fosfodiesterové vazby, zatímco Mg-A koordinuje fosfátovou skupinu a odcházející 3' koncovou hydroxylovou skupinu na RNA (Sosunov *et al.* 2003). Vznikne tak NTP a EC se stane posttranslokovaným, aniž by došlo

k posunu po DNA templátu. Pro případné opakování exopyrofosforolýzy je potřeba vrácení EC o jeden nukleotid opět do pretranslokovaného stavu.

Exonukleáza

Tato reakce se vyskytuje, podobně jako předchozí, v pretranslokovaných EC. NMP je přenášen na molekulu vody. Exonukleolytickým štěpením se dá odstranit nesprávně zařazený 3' koncový nukleotid, ale může probíhat, i když je RNA plně komplementární k templátu. Proces je vysoce stimulován přítomností nukleotidu, jež nemůže být použit jako substrát (nekomplementární NTP, neštěpitelný analog NTP a dNTP), který je koordinován Mg-B iontem (Sosunov *et al.* 2003). Význam této reakce v opravě transkripčních chyb je stále nejasný (Nudler 2009).

Endonukleáza

Endonukleolytické štěpení se vyskytuje ve vrácených EC, kdy se v $i+1$ místě vyskytne vnitřní část RNA transkriptu, čili nejméně předposlední nukleotid od 3' konce RNA. Nejčastější produkty štěpení jsou dinukleotidy (Zenkin *et al.* 2006), což může být vysvětleno interakcemi 3' koncového NMP RNA řetězce s takzvaným hradlovým tyrozinem⁴ 769 podjednotky Rpb2 eRNAP II, jež jsou udržovány během prvního kroku vrácení (Cheung a Cramer 2011). V takové situaci je 3' koncový NMP v tzv. opravném místě⁵ (Wang *et al.* 2009), kde pravděpodobně svým fosfátem, ribózovou složkou a bází koordinuje vstoupivší Mg-B a hydroxylovou skupinu vody (Zenkin *et al.* 2006). Je možné, že endonukleolytické štěpení je hlavním mechanismem, kterým jsou odstraňovány nesprávně zařazené nukleotidy.

Endopyrofosforolýza

RNAP je schopna ještě dalšího vnitřního štěpení, kdy se 5' konec štěpeného RNA vlákna přenesse na pyrofosfát (Rudd *et al.* 1994), na rozdíl od endonukleolytického štěpení, kde se přenáší na molekulu vody. Produkty štěpení jsou dinukleotidy a delší fragmenty RNA. Fyziologický smysl této reakce není zatím známý.

5 Katalytický cyklus syntézy RNA

Analýza trojrozměrných struktur EC v různých stavech elongace umožnila spolu s biochemickými daty navrhnout funkci prvků aktivního centra během syntézy RNA a navrhnout

⁴ V originále *gating tyrosine*.

⁵ V originále *proofreading site*.

obecné schéma kroků katalytického cyklu (viz Obr. 10) (Brueckner a Cramer 2008). Konkrétně se jedná o: 1) vstup NTP do aktivního centra RNAP a vazba NTP k EC v posttranslokovaném stavu, 2) přenos NMP na 3' konec transkriptu za tvorby fosfodiesterové vazby a uvolnění pyrofosfátu (chemický krok) a 3) dvoukrokovou translokaci, kdy se lešení nukleových kyselin posune vzhledem k RNAP a EC se dostane opět do posttranslokovaného stavu. Do dnešního dne byly trojrozměrné struktury EC určeny pro všechny kroky, tedy až na komplex těsně po reakci obsahující pyrofosfát. Zatímco chemický krok syntézy je dobře pochopen, přesné mechanismy zbylých kroků na své odhalení teprve čekají.

Hlavní strukturní elementy aktivního centra RNAP jsou mostový helix⁶ (BH) a spouštěcí smyčka⁷ (TL) β' podjednotky, jejichž koordinované konformační změny katalytický cyklus provádějí. BH je α -helix hlavního kanálu, který přiléhá k DNA templátovému vláknu v $i+1$ pozici. TL má strukturu dvou α -helixů přilehlých k mostovému helixu, jež jsou propojeny flexibilní smyčkou (Wang *et al.* 2006). Další vnitřní strukturní prvek, který může katalýzu ovlivnit, je F-smyčka bezprostředně sousedící s BH, která ovlivňuje skládání spouštěcí smyčky. Strukturní rozdíly ve F-smyčce jsou zodpovědné za odlišnou rychlost syntézy čítající i několik řádů u různě teplotně adaptovaných bakterií (Miropolskaya *et al.* 2009).

5.1 Vstup nukleotidu a jeho vazba k elongačnímu komplexu

Problém vstupu nukleotidu do RNAP se zdá být charakteristický pro vícepodjednotkové RNAP. U většiny DNA polymeráz, jednopodjednotkových RNA polymeráz a reverzních transkriptáz je aktivní místo pro substrát okamžitě přístupné, leč u vícepodjednotkových RNAP je toto místo hluboce ukryto v proteinové struktuře, kdy všechny hlavní cesty spojující jej s okolním roztokem jsou obsazeny nukleovými kyselinami (Westover *et al.* 2004a). Vzhledem k strukturním a biochemickým datům byly navrženy dva modely vstupu, které zde budou představeny. Strukturní studie EC se substrátem nebo jeho analogy také definovaly $i+1$ místo a přinejmenším další dvě místa vážící NTP, které se s tímto místem částečně překrývají, což naznačuje, že vstup NTP do aktivního centra RNAP je složitý proces s intermediátními stavy.

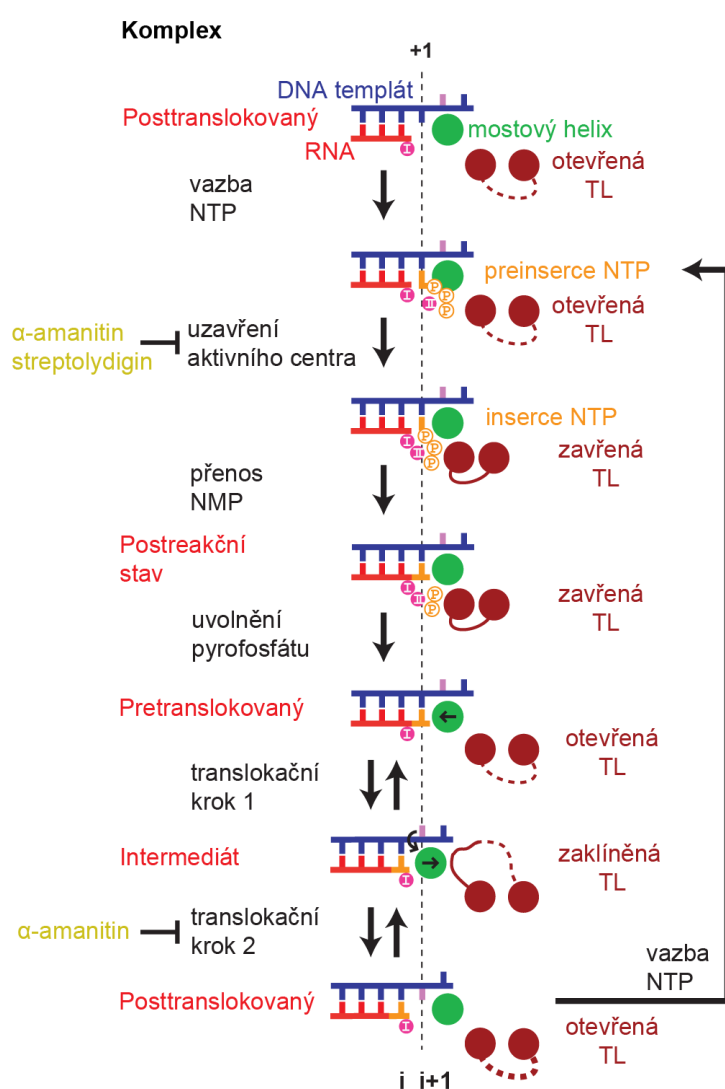
5.1.1 Vstup nukleotidu sekundárním kanálem

Prvně navržená a nejčastěji akceptovaná hypotéza vstupu NTP je ta, že NTP vstupuje do aktivního centra skrz sekundární kanál (zobrazen již na Obr. 5a). Z krystalografických dat EC je

⁶ Někdy znám též jako F-helix.

⁷ Synonymem je G-smyčka.

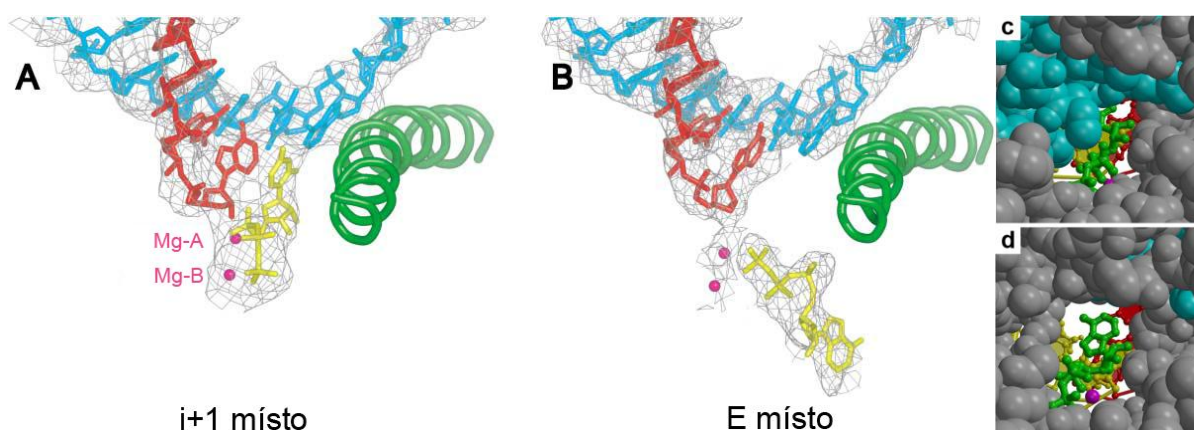
patrné, že je to jediná očividná cesta spojující aktivní centrum s okolním prostředím (Vassilyev *et al.* 2007b). Tuto hypotézu podporuje také nález NTP vázaných v sekundárním kanálu (Kettenberger *et al.* 2004; Westover *et al.* 2004a), v tzv. vstupním (neboli též E místě), které se však částečně překrývá s $i+1$ místem. V tomto místě je trifosfátová skupina NTP spolu s Mg-B orientována do aktivního centra, nukleosidový zbytek je vázán v sekundárním kanálu a neinteraguje s DNA templátovým vláknem (viz Obr. 11b) (Westover *et al.* 2004a). Funkční rolí vazby v tomto místě může být nastavení správné orientace nukleotidu před vstupem do $i+1$ místa (Obr. 11a) nebo zvýšení lokální koncentrace NTP v blízkosti aktivního centra. Vazba nukleotidu v tomto místě také může stimulovat exonukleázovou aktivitu RNAP (Sosunov *et al.* 2003).



Obr. 10: Schématický diagram cyklu přidání nukleotidu zachycující dynamiku aktivního centra. Mg-A zobrazen jako I a Mg-B zobrazen jako II, P značí fosfátovou skupinu, v kruhu mostový helix a dva α -helixy tvořící bázi spouštěcí smyčky (zobrazeny kolmo k rovině obrázku), spouštěcí smyčka (TL) zobrazena jako čára, žlutě značené inhibitory jednotlivých kroků. Posunutí mostového helixu naznačeno šipkami v zeleném kruhu. Upraveno podle (Brueckner a Cramer 2008).

Pro vstup NTP sekundárním kanálem je však potřeba, aby byl EC v posttranslokovaném stavu, kdy je spouštěcí smyčka v otevřené konformaci a neuzavírá tak pór sekundárního kanálu (Vassilyev *et al.* 2007b), což vstup časově limituje (viz Obr 11d). Sekundární kanál má elektrostaticky negativní vnitřní povrch, což zpomaluje difuzi negativně nabitých nukleotidů,

kteřé mají v komplexu NTP-Mg²⁺ záporný náboj -2. Počítačové simulace nicméně naznačují, že i při fyziologických koncentracích nukleotidů jsou komplementární NTP schopny se v *i+1* místě vázat rychlostí cca 20 s⁻¹ (Batada *et al.* 2004). Experimentálně byla však pro bRNAP i eRNAP II určena rychlost vazby zhruba padesátkrát vyšší (Kireeva *et al.* 2009). Ani vazba NTP v E místě, u které se předpokládá, že se děje mnohem rychleji než vstup NTP do *i+1* místa (Batada *et al.* 2004), není schopná vysvětlit tak rychlé templátově specifické oddělení nukleotidů z prostředí, protože NTP vázaný v E místě se nepáruje s bází templátového vlákna DNA (Westover *et al.* 2004a).



Obr. 11: (a) Model nukleotidu (žlutě) vázícího se v *i+1* místě a (b) E místě eRNAP II. Červeně RNA, modře templátová DNA, zeleně mostový helix, růžově Mg²⁺ ionty. Upraveno podle (Westover *et al.* 2004a). (c) Model uzavřené a (d) otevřené spouštěcí smyčky (tyrkysové) bRNAP, která uzavírá sekundární kanál. Pohled směrem do aktivního místa, NTP zeleně, RNA červeně, DNA žlutě, Mg²⁺ iont fialově. Upraveno podle (Vassilyev *et al.* 2007b)

5.1.2 Vstup nukleotidu hlavním kanálem

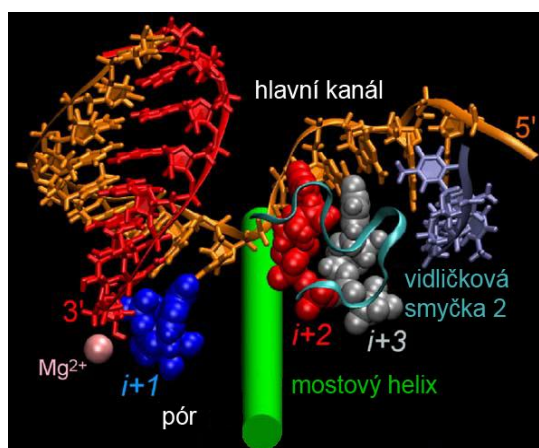
Na základě kinetických studií a počítačového modelování jednonukleotidových adicí k RNA byla navržena alternativní hypotéza o vstupu NTP využívající hlavní kanál (viz Obr. 12) (Gong *et al.* 2005). Přidání nukleotidu RNA polymerázou totiž nevykazuje jednoduchou hyperbolicou závislost na koncentraci substrátového NTP (Foster *et al.* 2001). Vysvětlením může být buď vazba druhého alosterického NTP k EC (Foster *et al.* 2001) nebo vazba substrátového NTP k pretranslokovanému EC, která zároveň urychlí translokaci a vstup NTP (Nedialkov *et al.* 2003). Obě tato vysvětlení sdílejí tezi, že se NTP může párovat s templátovým vláknem DNA v hlavním kanálu ještě před aktivním místem enzymu, ale liší se v následném osudu tohoto NTP, které buďto v hlavním kanálu po translokaci zůstává nebo putuje do aktivního centra a stane se substrátem, blíže viz kapitoly 5.3.3 a 5.3.4.

Zdá se, že přítomnost komplementárních NTP na pozici *i+2* a *i+3* může stimulovat rychlost přidání nukleotidu v *i+1* místě a snižovat účinnost zařazení špatného nukleotidu.

U eRNAP II v přítomnosti α -amanitinu může stimulovat reverzi vazby, kdy je uvolněný NTP, který byl předtím uzavřen v aktivním centru (Gong *et al.* 2005). Tyto zmíněné efekty nelze vysvětlit pouze pomocí modelu vstupu NTP sekundárním kanálem, protože vazba NTP v E místě není templátově specifická. Alespoň část těchto jevů lze ale vysvětlit pomocí špatné orientace templátu, kdy se občas templátová báze překlopí mimo hybrid, což bylo u bRNAP detekováno (Kashkina *et al.* 2006). Tyto efekty také vyžadují vysoké koncentrace NTP, reverze vazby není odlišitelná od exonukleázy stimulované NTP v E místě (Sosunov *et al.* 2003).

Proti modelu vstupu hlavním kanálem hovoří i zjevný nedostatek místa pro NTP v tomto místě (Korzheva *et al.* 2000). RNAP však dokáže přepisovat do velmi krátké vzdálenosti od překážek na DNA po směru transkripce, jako jsou objemné léze na DNA (Tornaletti a Hanawalt 1999) nebo třeba galaktózový represor (Lewis *et al.* 2008), což značí pozoruhodnou strukturní plasticitu DNA vazebného místa v hlavním kanálu. Další spory se vedou o přístupnosti $i+2$ a $i+3$ míst pro párování s nukleotidy. V některých EC je v těchto místech duplex denaturovaný (Gnatt *et al.* 2001; Westover *et al.* 2004a), v jiných tomu tak není (Kettenberger *et al.* 2004; Vassilyev *et al.* 2007a). Všechny EC eRNAP II, které byly použity ke krystalizaci, obsahovaly mezery nebo nekomplementární DNA v tomto místě, takže se z jejich struktur na tání plně dvouřetězcové DNA usuzovat nedá. Biochemické studie využívající přenos energie fluorescenční rezonancí (FRET) naznačují, že u eRNAP II je pouze $i+2$ místo denaturované a volné k párování (Kashkina *et al.* 2007). Předpokládaná vazba NTP v $i+2$ místě zahrnuje vidličkovou smyčku 2, která by v otevřené konformaci dovolila difuzi NTP spolu s $+2$ templátovou bází do $i+1$ místa, nebo alternativně spouštěcí smyčku, kdy by nukleotid byl doručen do $i+1$ místa pod mostovým helixem za současného uzavření spouštěcí smyčky, ale v tomto alternativním případě by NTP během přenosu do $i+1$ místa ztratil kontakt s templátovou bází (Erie a Kennedy 2009). Hlavní argument proti tomuto modelu je, že NTP nebyl v strukturách EC v hlavním kanálu nikdy vizualizován, což ale může být chyba samotného procesu krystalizace.

Obr. 12: Model vstupu NTP hlavním kanálem. Templátová DNA oranžově, netemplátová DNA modrošedě, RNA červeně, NTP v pozici $i+3$ stříbrně, $i+2$ pozici červeně, $i+1$ pozici modře, Mg-A růžově. Další prvky barevně označeny u obrázku. Upraveno podle (Gong *et al.* 2005).



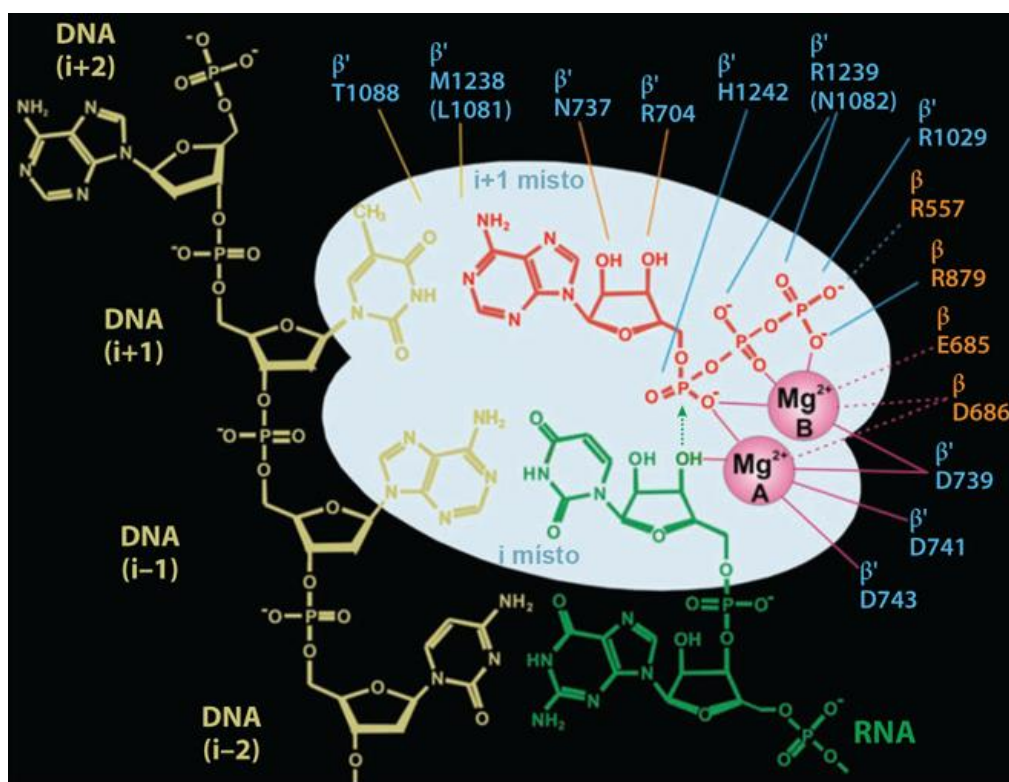
5.1.3 Vazba nukleotidu k elongačnímu komplexu

Poprvé bylo navázání komplementárního NTP v $i+1$ místě pozorováno v EC eRNAP II s transkripčně 3'-deoxyterminovanou RNA, kde trifosfátová skupina i ribózová složka zaujímaly optimální pozici pro katalytické přidání NTP (Westover *et al.* 2004a). Když však autoři přidali ke stejnému připravenému EC nukleotid nekomplementární k templátové bázi v $i+1$ místě, našli tento NTP navázaný v již výše zmíněném E místě, které se s $i+1$ místem částečně překrývá. V tomto místě báze NTP míří směrem od templátové DNA a trifosfátová složka NTP je spojena s hořečnatými ionty aktivního místa. Autoři postulovali význam E místa jakožto kontrolního bodu správného párování, z kterého může pouze komplementární NTP rotovat do $i+1$ místa (Westover *et al.* 2004a).

Jinak vázaný substrát v EC byl pozorován, když se k terminaci řetězce RNA použil komplementární, ale nehydrolyzovatelný analog NTP s methylenovou skupinou mezi α - a β -fosfáty NTP (Kettenberger *et al.* 2004). Báze tohoto analogu párovala s templátovou DNA, ale ribózová složka a trifosfátová skupina byla směřována pryč od 3' konce RNA a Mg-B iont, který vchází do RNAP s NTP, byl vzdálený od Mg-A tak, že nemohla proběhnout katalýza (cca 6 Å oproti běžným 4 Å). Toto místo bylo nazváno místem preinzerčním, které se liší, ale částečně překrývá s $i+1$ a E místem. Preinzerční pozice byla dále analyzována v krystalech bRNAP *T. thermophilus* za přítomnosti antibiotika streptolydiginu, které fixuje tento stav EC (Vassylyev *et al.* 2007b). Vazba nukleotidu v preinzerčním místě indukuje složení spouštěcí smyčky do α -helikální podoby v její spodní části. Následuje změna pozice NTP, kdy trifosfátová skupina a ribózová složka zaujmou optimální pozici pro katalytické přidání a báze se *stacking* interakcemi spojí s 3' terminálním nukleotidem syntetizované RNA. Složená TL uzavře přístup do sekundárního kanálu a NTP je tak oddělen od prostředí, což vysvětluje zpoždění v inaktivaci EC chelatací Mg^{2+} iontů pomocí EDTA (Gong *et al.* 2005) a částečnou neschopnost EC vyměňovat substrát s okolím (Kireeva *et al.* 2008). Rychlost vazby NTP k EC eRNAP II byla odhadnuta na $2,5 \mu M^{-1}s^{-1}$ a rychlost oddělení „správného“ (ve smyslu komplementarity k templátové bázi v $i+1$ místě) NTP od prostředí složením TL na $1200 s^{-1}$ (Kireeva *et al.* 2008). Pro porovnání, oddělení „nesprávného“ NTP od prostředí dosahuje rychlosti pouze $13 s^{-1}$ (Kireeva *et al.* 2008). Některé aminokyselinové zbytky TL se přímo dotýkají NTP a jejich mutace narušuje katalytickou aktivitu bRNAP i eRNAP II, takže TL hraje také zásadní roli ve správné vazbě nukleotidu (Zhang *et al.* 2010). Správné složení TL do zavřené konformace je pravděpodobně jeden z limitujících kroků katalytického cyklu (Zhang *et al.* 2010). Aminokyseliny účastnící se vazby templátové báze a NTP v $i+1$ místě jsou zobrazeny na Obr. 13.

5.2 Inkorporace nukleotidu do řetězce RNA

Pokud je příchozí nukleotid správně orientován, jak je zobrazeno na Obr. 13, dojde k chemickému kroku katalytického cyklu, kdy Mg-A koordinuje atakující 3' koncovou hydroxylovou skupinu RNA a cílovou α -fosfátovou skupinu substrátového NTP, zatímco Mg-B kooordinuje α -fosfátovou a pyrofosfátovou skupinu substrátu (Vassilyev *et al.* 2007b). Pyrofosfát spolu s Mg-B postreakční komplex opouští, což je patrně doprovázeno otevřením spouštěcí smyčky a zpřístupněním sekundárního kanálu jako únikové cesty, což by mělo nastat ještě před vlastní translokací (Brueckner a Cramer 2008). Některá data však naznačují, že opuštění pyrofosfátu a otevření TL může být spojeno s translokací, a že pyrofosfát může EC opouštět až po translokaci (Johnson *et al.* 2008). Zdá se, že pyrofosfát může v EC zůstat vázaný i pár vteřin, což je podstatně delší doba, než je průměrné trvání jednoho katalytického cyklu (Johnson *et al.* 2008).



Obr. 13: Zobrazení interakcí v katalytickém centru RNAP. Číslování odpovídá *T. thermophilus*, v závorkách uvedeny protějšky konzervovaných aminokyselin v Rpb1 u eRNAP II *S. cerevisiae*. Koordinace Mg^{2+} iontů růžové čáry, vazba a správná orientace NTP modré čáry, rozeznání „správného“ NTP zlaté čáry. Vodou zprostředkované interakce zobrazeny přerušovanou čarou. Zbytky R1029 a R1239 spouštěcí smyčky spolu s R557 a R879 β podjednotky váží NTP β - a γ -fosfáty skrz vodíkové vazby a elektrostatické interakce. H1042 β' podjednotky hraje důležitou roli vazbou s α -fosfátem (a možná i β -fosfátem) a tím ulehčuje nukleofilní atak 3'-OH skupiny. K zajištění zařazení „správného“ nukleotidu zbytky M1238 spouštěcí smyčky a T1088 mostového helixu kontaktují hydrofobními a van der Waalsovými interakcemi bázi NTP a DNA v $i+1$ místě. β' N737 a R704 tvoří vodíkové vazby s 2'- a 3'-OH skupinami ribóзовého kruhu a diskriminují tak deoxyribonukleotidy. Upraveno podle (Nudler 2009).

5.3 Translokace

Hlavní roli v translokaci hrají spojené konformační změny mostového helixu a spouštěcí smyčky, což potvrdily mutační studie těchto segmentů, které ovlivnily jednak rovnováhu mezi pre- a posttranslokovanými stavy EC a navíc také celkovou rychlost syntézy (Tan *et al.* 2008; Zhang *et al.* 2010). Ačkoliv je translokace rozsáhle studována, přesné molekulární mechanismy musí být teprve stanoveny. Zatím byly představeny čtyři modely translokace: model aktivní lokomoce, model Brownovy rohatky, alosterický model a nukleotidem poháněný model.

5.3.1 Model aktivní lokomoce

Model aktivní lokomoce, známý spíš pod názvem model motorového tahu⁸, byl původně navržen na základě analýz EC jednopodjednotkové RNAP fága T7 (Yin a Steitz 2004). Postuluje, že translokace přímo vyžaduje energii uvolněnou z hydrolýzy NTP, tudíž je těsně spojena s inkorporací nukleotidu do řetězce RNA a uvolněním pyrofosfátu. Tento model v dnešní době nemá mnoho zastánců, protože není schopen vysvětlit možnost inaktivace vícepodjednotkových RNAP vrácením se, kdy se 3' konec RNA dostane mimo aktivní centrum, a opětovným navrácením RNAP do aktivního stavu bez přítomnosti syntézy RNA (Komissarova a Kashlev 1997). Stejně tak tento model nevysvětluje schopnost vrácení RNAP o velké množství nukleotidů DNA templátu při procesivním endonukleolytickém štěpení RNA (Feng *et al.* 1994). Navíc se nezdá, že by rychlost elongace závisela na koncentraci pyrofosfátu v okolí (Wang *et al.* 1998), a zdá se, že strukturní změny RNAP zřejmě nejsou schopny ireverzibilně stabilizovat posttranslokovaný stav, což také hovoří proti tomuto modelu (Vassilyev *et al.* 2007b). Další argumenty proti přinesla analýza jednotlivých molekul RNAP určující poměr mezi silou a rychlostí elongace za saturujících i nesaturujících koncentrací nukleotidů. S rostoucí koncentrací NTP je potřeba vyvinout větší sílu k zabránění elongace, což se s modelem motorového tahu neslučuje (Abbondanzieri *et al.* 2005).

5.3.2 Model Brownovy rohatky

Druhý model, nejčastěji uznávaný (Brueckner a Cramer 2008), se nazývá model Brownovy nebo též termální rohatky. Postuluje, že translokace RNAP využívá energii získanou z termálních fluktuací ve formě Brownova pohybu (Bar-Nahum *et al.* 2005) a postupuje pouze po jednobázových přírůstcích (Abbondanzieri *et al.* 2005). Translokace dle tohoto modelu začíná

⁸ V originále *power stroke model*.

v pretranslokovaných EC s otevřenou TL a již bez pyrofosfátu. Tvrdí, že rovnováha mezi pre- a posttranslokovaným stavem je ustanovena před difuzí dalšího NTP do aktivního centra (Bai *et al.* 2004). Tomu odpovídá zjištění, že je posttranslokovaný stav stabilizovaný příchozím komplementárním nukleotidem (Bar-Nahum *et al.* 2005), a nepřímo tomu odpovídá i zjištění, že pyrofosfát u jednopodjednotkových RNAP posouvá translokační rovnováhu k pretranslokovanému stavu (Guo a Sousa 2006). Bylo popsáno několik strukturních variant modelu Brownovy rohatky.

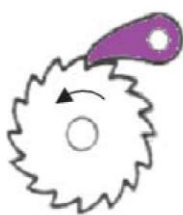
První varianta byla založena na srovnávací analýze bRNAP a eRNAP II a do centra translokace stavěla strukturní oscilace BH (Gnatt *et al.* 2001). Idea strukturní flexibility BH čerpala z pozorování dvou odlišných konformací BH, takzvané ohnuté u *T. aquaticus* (Zhang *et al.* 1999) a rovné u eRNAP II *S. cerevisiae* (Cramer *et al.* 2001). Ohýbání BH mělo indukovat translokaci lešení nukleových kyselin o jeden nukleotid a následná relaxace uvolnit $i+1$ místo pro příchozí NTP (Gnatt *et al.* 2001). Tato varianta byla dále potvrzena studiemi naznačujícími, že tyto strukturní oscilace BH korelují s translokací a že se nemůže vázat nukleotid v $i+1$ místě, když je BH v ohnuté konformaci, a byla nazvána *Swing-gate model of NTP entry* (model vstupu nukleotidu otočnými závorami) (Epshtein *et al.* 2002). Tato zjištění byla použita jako první strukturní varianta Brownovy rohatky, kde NTP funguje jako stacionární západka, bránící vracení RNAP, a BH jako vratná západka, tlačící RNAP dopředu ve vztahu k lešení nukleových kyselin (viz Obr. 14) (Bar-Nahum *et al.* 2005).

Analýza mutant bRNAP *E. coli* v BH a TL spolu s novými krystalografickými daty však zpochybnila centrální úlohu BH v transkripci a roli jeho ohýbání (Toulokhonov *et al.* 2007; Vassylyev *et al.* 2007b). Byla navržena nová varianta, ve které byla hlavní role přiřknuta konformačním změnám TL, neboť bylo pozorováno, že TL se umí složit do α -helikální konformace, zřejmě v závislosti na kontaktu s příchozím NTP. Takto složená TL dále stabilizuje vazbu nukleotidu a uzavírá sekundární kanál (Vassylyev *et al.* 2007b). Translokace by tak byla preferovaná pouze bráněním vracení EC a TL by fungovala jako vratná západka (Nudler 2009). Tato varianta však není schopná vysvětlit efekty bodových mutací G1136S a I1134V ve spouštěcí smyčce RNAP *E. coli* na translokaci v nepřítomnosti substrátu. První ze dvou zmiňovaných mutací upřednostňuje posttranslokovaný stav EC a druhá mutace zase vracení EC (Bar-Nahum *et al.* 2005). Samovolné skládání TL bez přítomnosti NTP by se však podle této varianty dít nemělo (Vassylyev *et al.* 2007b).

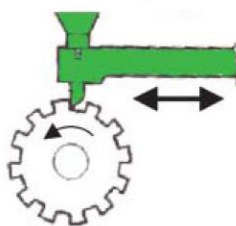
Poslední strukturní varianta Brownovy rohatky bere v potaz konformační změny BH i TL, ve které BH funguje jako vratná a TL jako stacionární západka. Tato varianta byla formulována na základě struktury EC eRNAP II s α -amanitinem (Brueckner a Cramer 2008).

Před translokací je BH v rovné konformaci a TL je otevřená. Pak se BH dostane do posunuté konformace (odlišné od původně pozorované ohnuté konformace), kdy se přiblíží o 2,5 Å k 3' konci RNA v hybridu. V tomto stavu BH částečně okupuje $i+1$ místo, což vyústí v posunutí hybridu DNA:RNA do i místa. Posunutí BH je stabilizováno TL, která se složí do tak zvané zaklíněné konformace bránící sklouznutí BH zpátky do rovné polohy. V druhém translokačním kroku se templátová báze DNA dostane do $i+1$ místa, mostový helix se vrátí do rovné konformace a současně se spouštěcí smyčka znovu otevře. Tím se uvolní $i+1$ místo pro vazbu dalšího NTP. Tato varianta byla použita v navrženém obecném mechanickém modelu celého cyklu katalytické syntézy (viz Obr. 10).

stacionární západka



vratná západka



Obr. 14: Model rohatkového mechanismu. Ozubeným kolem je v tomto případě přeneseně myšlena RNAP. Geometrie a umístění stacionární západky (vlevo) povolí kolu, které čerpá energii z termálních fluktuací, pohyb pouze jedním směrem. Vratná západka (vpravo) se sama může pohybovat dopředu i dozadu, ozubené kolo však přitom tlačí jen jedním směrem. Různé

varianty tohoto modelu se liší v tom, které strukturní části RNAP je přisouzena funkce západky stacionární nebo vratné. Upraveno podle (Bar-Nahum *et al.* 2005).

5.3.3 Alosterický model

Všechny předchozí modely naznačovaly, že translokace není limitujícím krokem katalytického cyklu a translokační rovnováha je ustanovena před vazbou dalšího NTP v $i+1$ místě. Analýza přechodového stavu bRNAP *E. coli* odhalila bifázickou kinetiku inkorporace NTP, z čehož byla vyvozena existence rychlé (aktivované) a pomalé (neaktivované) cesty přidání nukleotidu (Foster *et al.* 2001). Spolu s pozorováním, že přítomnost nehydrolyzovatelného analogu substrátového NTP zvýší rychlost přidání substrátového NTP do rostoucího řetězce cca 30krát, byl postulován model neesenciální aktivace, ve kterém se RNAP aktivuje vazbou substrátového NTP v alosterickém místě (odlišném od katalytického) a je schopna katalyzovat syntézu rychleji, než neaktivovaná RNAP (Foster *et al.* 2001). Takové alosterické místo by umožnilo RNAP odpovídat při hladovění na nukleotidy. Pokud by se vyskytl alespoň jeden nukleotid v limitující koncentraci, došlo by k vrácení RNAP do neaktivovaného stavu (Foster *et al.* 2001). Bylo navrženo, že neaktivovaný stav je hlavní stav RNAP umožňující regulaci elongace (Holmes a Erie 2003). U výše zmíněných modelů by přítomnost nehydrolyzovatelného analogu snížila rychlost elongace, protože by fungoval jako kompetitivní inhibitor.

Tento model byl dále rozvinut i se snahou identifikovat alosterické místo z dostupných sekvencí a struktur. Bylo navrženo, že alosterický NTP by se mohl vázat do vidličkové smyčky 2

Rpb2 podjednotky eRNAP II a smyčky vázající streptolydigin β podjednotky u bRNAP (Holmes a Erie 2003). Tato oblast je u eukaryot i prokaryot bohatá na glycin a u eukaryot dokonce obsahuje GK sekvenční motiv, což je rys charakteristický pro P-smyčky domén vázajících NTP (Holmes a Erie 2003). Lysin ze zmíněného motivu by mohl vázat α -fosfát nukleotidu (Via *et al.* 2000). Navíc tato oblast obsahuje konzervovaný Walker B motiv (DXXG) (Holmes a Erie 2003), jehož aspartát váže hořčnatý iont a ten zase γ -fosfát NTP (Via *et al.* 2000). *In silico* modelováním byly určeny i zbytky zodpovědné za rozlišení mezi ribózou a deoxyribózou. Konzistentní s navrhovanou rolí této oblasti je i studie RNAP s mutacemi ve vidličkové smyčce 2, které vedly k defektní inkorporaci nukleotidů (Naji *et al.* 2008). Specifita alosterického místa ($i+2$ místa) pro NTP, který má být inkorporován, je dána +1 templátovou bází, jenž se v pretranslokovaném stavu nachází v hlavním kanálu (Holmes a Erie 2003). Vazba alosterického NTP ke smyčce může následně ovlivnit její konformaci, která následně může ovlivnit konformaci sousedícího mostového helixu a dojde k translokaci. Tím se posune +1 templátová báze do $i+1$ místa, kde může párovat s katalytickým NTP, jenž přichází sekundárním kanálem. Naproti tomu v neaktivovaném stavu EC by se nejdříve NTP pároval s +1 bází v alosterickém místě hlavního kanálu a s translokací by byl přenesen do aktivního centra. To by vysvětlovalo pozorovanou zvýšenou přesnost transkripce neaktivovanou RNAP, protože „správný“ nukleotid by byl vybrán dvakrát. Syntéza nechává RNAP dlouho v aktivovaném stavu, takže alosterické místo by nemuselo být obsazeno pro každý nukleotid templátu (Holmes a Erie 2003). Bylo naznačeno, že vazba nukleotidu komplementárního k +2 templátové bázi taktéž usnadňuje translokaci (Nedialkov *et al.* 2003). Tento model by to vysvětlil tak, že aktivovaná RNAP preferenčně setrvává v posttranslokovaném stavu, kde je +1 báze již v katalytickém místě, takže alosterické místo ($i+2$) je specifické pro +2 templátovou bázi, zatímco zabrzděné EC (použito pro tyto experimenty) přetrvává hlavně v pretranslokovaném stavu (Holmes a Erie 2003).

5.3.4 Nukleotidem poháněný model

Bifázická kinetika přidání nukleotidu do syntetizované RNA byla popsána také u lidské eRNAP II (Nedialkov *et al.* 2003). I v tomto případě byla frakce rychleji syntetizujících RNAP určena jako posttranslokované EC a pomaleji syntetizujících jako pretranslokované EC. Obě tyto frakce ale byly vyloženy jako EC na rychlé (aktivované) cestě přidání nukleotidu. Studie Nedialkova a spolupracovníků (Nedialkov *et al.* 2003) naznačuje, že elongační faktor TFIIF a antigen virusoidu hepatitidy δ stimulují translokaci a i v tomto případě byl pozorován urychlující efekt komplementárního NTP k +2 templátové bázi (Nedialkov *et al.* 2003) a též i k +3 a +4 templátové bázi (Gong *et al.* 2005) na translokaci. Spolu s faktem, že v některých

komplexech eRNAP *S. cerevisiae* je až do $i+4$ místa templátová DNA volná k párování (Gnatt *et al.* 2001; Westover *et al.* 2004a), byl postulován u aktivovaných EC následující model: NTP vstupují hlavním kanálem a párují se s templátovým vláknem denaturovaného duplexu DNA, hlavní indukující silou translokace je přenos páru templátové báze a komplementárního NTP, jenž je na řadě v začlenění do řetězce syntetizované RNA, přes mostový helix do $i+1$ místa (Nedialkov *et al.* 2003). Tento model zaručuje vysokou přesnost syntézy RNA, protože by hned několik nukleotidů bylo předem vloženo a srovnáno dle komplementarity bází. Následně by byly zařazeny do rostoucího řetězce jen ty NTP, které by vydržely cestu přes mostový helix do $i+1$ místa spárované s templátovou DNA. V aktivním centru by po další kontrole párování byly nekomplementární NTP a případně dNTP odstraněny sekundárním kanálem, což se slučuje s jeho negativně nabitým vnitřním povrchem (Gong *et al.* 2005). Stejnou cestou odchází i pyrofosfát. V tomto modelu by sekundárním kanálem mohl přicházet substrát k neaktivovaným posttranslokovaným komplexům vzniklých zabrzděním v nedostatku substrátových NTP, takže neaktivované RNAP by fungovaly jednoduchým modelem Brownovy rohatky (Gong *et al.* 2005).

Další podpora pro přítomnost párování NTP k templátu ještě před $i+1$ místem pochází ze studií ukazujících, že přítomnost dalšího nukleotidu komplementárního k templátu urychluje vypuzení pyrofosfátu z předchozí inkorporační události cca 200krát (Johnson *et al.* 2008). Alosterické modely to vysvětlují tak, že spouštěcí smyčka se nemůže samovolně otevřít dostatečně rychle a po inkorporaci NTP zůstává pyrofosfát v aktivním centru. Vazba NTP v alosterickém místě k pretranslokovanému EC může stimulovat otevření TL a vypuzení pyrofosfátu (Nedialkov *et al.* 2003). Alternativně však pyrofosfát může zůstat po dobu translokace v aktivním centru a být vytlačen až příchozím NTP v posttranslokovaném stavu, což neodporuje jednoduchému rohatkovému modelu (Johnson *et al.* 2008).

Nutno dodat, že oba modely, alosterický i nukleotidem poháněný, neodporují tomu, že pohyb RNAP vzhledem k lešení nukleových kyselin je založen na energii z termálních fluktuací, jak tvrdí model Brownovy rohatky. Proto se těmito modelům někdy souhrnně říká model ulehčené Brownovy rohatky, kde roli vratné západky hraje nukleotid v alosterickém místě a roli stacionární západky hraje nukleotid v $i+1$ místě (Erie a Kennedy 2009). Konformační změny EC, které mohou být zapojeny v translokaci, jsou zobrazeny na Obr. 15.

6 Závěr

V této práci jsem se pokusil podat ucelený pohled na architekturu elongačního komplexu a katalytický cyklus RNA syntézy tak, jak jsou v dnešní době chápány. Z krystalografických



Obr. 15: Konformační změny EC *S. cerevisiae*, u kterých je předpokládáno, že souvisí s translokací. Šedě DNA, červeně RNA, růžově příchozí NTP. BH může zaujmout rovnou (modře) a posunutou konformaci (světle růžová), TL může zaujmout otevřenou (zeleně) a zavřenou (fialově) konformaci. Vidličková smyčka 2 byla pozorována v konformacích: otevřená (žlutě), částečně zavřená (oranžově) a zavřená (tyrkysově). Oblast se zbytky, které vážou katalytické Mg^{2+} světle šedě. Převzato z (Erie a Kennedy 2009).

studií je patrná lokalizace nukleových kyselin v proteinovém komplexu RNAP. Jediným problémem je vizualizace netemplátového vlákna DNA v denaturované oblasti a úseku dvouřetězcové DNA proti proudu transkripce, protože naprostá většina doposud studovaných EC byla rekonstituována s uměle připraveným lešením nukleových kyselin postrádajícím tyto oblasti. V elongačním komplexu s kompletním lešením tyto úseky nebyly pozorovány, zřejmě díky velké pohyblivosti těchto prvků (Kettenberg *et al.* 2004). Nejnovější krystalografické studie EC se zabývají hlavně pozastavením, vrácením, aretací a opětovnou reaktivací eRNAP II, což jsou jevy související s opravnou aktivitou RNAP, která je schopna sama nebo v přítomnosti dalších faktorů odštěpit špatně zařazené nukleotidy (Cheung a Cramer 2011; Sydow *et al.* 2009; Wang *et al.* 2009). Tyto práce kromě umístění a kontaktů vrácené RNA v sekundárním kanálu také odhalily další dvě konformace spouštěcí smyčky ve výše zmíněných stavech EC, konkrétně tzv. uvězněnou a uzamčenou.

I nové přístupy ve výzkumu RNAP přinesly zajímavá zjištění. Vysoce průchodnou mutagenézí mostového helixu aRNAP u *Methanocaldococcus jannaschii*, následným *in vitro* sestavením funkčního enzymu z rekombinantně připravených podjednotek a podrobení arteficiálně připravené RNAP transkripčním testům bylo naznačeno, že ohýbání C- a N-terminálních oblastí (označeny jako panty), jež nebylo z krystalografických studií patrné, hraje důležitou roli v cyklu přidání nukleotidu koordinováním konformačních změn v přilehlých oblastech, což si možná vyžádá přehodnocení strukturních základů translokace (Weinzierl 2010).

Katalýza je během transkripce v aktivním centru RNAP regulována rozličnými faktory, zahrnujícími proteiny, regulační sekvence v DNA i RNA, nekódující RNA, nízkomolekulární látky, metabolity, peptidy a antibiotika. Obecně tyto faktory buď ovlivňují pohyblivost mostového helixu nebo spouštěcí smyčky, nebo ovlivňují vazbu hořčnatých iontů. Mnoho

z nich působí na aktivní centrum skrz sekundární kanál a některé jsou zvláště důležité pro stimulaci štěpení nascentní RNA, protože dodávají do aktivního centra Mg-B iont potřebný pro katalýzu. Limitace rozsahu této práce mi však nedovolí pojednat o nich blíže.

Co se týče samotného cyklu přidání nukleotidu, nejdůležitější otázkou zůstává, jakou cestou přichází do aktivního místa RNAP nukleotidy, od čehož se odvíjí i předpokládané modely translokace. Přímý důkaz zatím chybí. Zatímco strukturní data hovoří spíše ve prospěch cesty sekundárním kanálem, biochemická data hovoří ve prospěch cesty hlavním kanálem. Je možné, že jsou přípustné obě varianty a výběr dané cesty záleží na konkrétních podmínkách v buňce, koncentracích NTP a kontextu sekvence templátové DNA (Erie a Kennedy 2009). Toto téma zůstává i nadále intenzivně zkoumáno. Nejnovější kinetická studie opět naznačila existenci alosterického $i+2$ místa, některých výše zmíněných efektů NTP vázaného v tomto místě na elongaci, možnost přenesení nukleotidu s templátovou bází z $i+2$ do $i+1$ místa a funkci vidličkové smyčky 2 jakožto součásti alosterického místa vázající NTP (Kennedy a Erie 2011). Také definitivní rozhodnutí, zda translokace může být krokem limitujícím rychlost elongace, čeká na přímé měření pomocí FRET nebo jiných biofyzikálních metod.

In silico predikovaná RNA polymeráza ORF6 cytoplasmatického *killer* plasmidu pGKL2 u *Kluyveromyces lactis*, o jejíž charakterizaci se se školitelem snažíme, je zajímavá z několika důvodů. Vykazuje homologii cca 250 aminokyselin s podjednotkami RPB1 a RPB2 eRNAP, které odpovídají 11 motivům tvořícím zhruba polovinu aktivního místa sdílenou u všech vícepodjednotkových RNAP (Ruprich-Robert a Thuriaux 2010). Je 113 kDa velká, obsahuje konzervovaný motiv vážící Mg^{2+} ionty, mostový helix, vidličkovou smyčku 2, vazebné místo pro hybridní molekulu DNA:RNA a „přepínačovou“ doménu 3. Naproti tomu nemá žádnou detekovatelnou sekvenční homologii se spouštěcí smyčkou, „přepínačovými“ doménami 1 a 5, a také postrádá „kormidlo“ a víčko RBP1 podjednotky. Tyto domény tak nemusí být pro transkripci sekvenčně (možná ani strukturně) konzervované (Ruprich-Robert a Thuriaux 2010). Plyne z toho však fakt, že syntéza RNA může probíhat i bez rozsáhlých struktur stabilizujících dvoušroubovici DNA po směru transkripce. Další zajímavostí je, že sekvence ORF7 stejného plasmidu vykazuje homologii ke dvěma C-terminálním doménám RBP1 podjednotky, a tvořila by tak 17 kDa velkou podjednotku předpokládané RNA polymerázy pGKL2 plasmidu (Schaffrath *et al.* 1995). To by znamenalo, že polypeptid RBP1 (β') podjednotky může být v konkrétním místě rozdělen za současného zachování jeho funkce.

Seznam použité literatury

- Abbondanzieri, E. A., Greenleaf, W. J., Shaevitz, J. W., Landick, R., Block, S. M. (2005). "Direct observation of base-pair stepping by RNA polymerase." *Nature*, 438(7067), 460-465.
- Achberger, E. C., Whiteley, H. R. (1980). "The interaction of Escherichia coli core RNA polymerase with specificity-determining subunits derived from unmodified and SP82-modified Bacillus subtilis RNA polymerase." *Journal of Biological Chemistry*, 255(24), 11957-11964.
- Allison, L. A., Simon, L. D., Maliga, P. (1996). "Deletion of rpoB reveals a second distinct transcription system in plastids of higher plants." *EMBO Journal*, 15(11), 2802-2809.
- Bai, L., Shundrovsky, A., Wang, M. D. (2004). "Sequence-dependent kinetic model for transcription elongation by RNA polymerase." *Journal of Molecular Biology*, 344(2), 335-349.
- Bar-Nahum, G., Epshtein, V., Ruckenstein, A. E., Rafikov, R., Mustaev, A., Nudler, E. (2005). "A ratchet mechanism of transcription elongation and its control." *Cell*, 120(2), 183-193.
- Bar-Nahum, G., Nudler, E. (2001). "Isolation and characterization of sigma(70)-retaining transcription elongation complexes from Escherichia coli." *Cell*, 106(4), 443-451.
- Batada, N. N., Westover, K. D., Bushnell, D. A., Levitt, M., Kornberg, R. D. (2004). "Diffusion of nucleoside triphosphates and role of the entry site to the RNA polymerase II active center." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(50), 17361-17364.
- Bollum, F. J. (1959). "Thermal conversion of nonpriming deoxyribonucleic acid to primer." *Journal of Biological Chemistry*, 234(10), 2733-2734.
- Brueckner, F., Cramer, P. (2008). "Structural basis of transcription inhibition by alpha-amanitin and implications for RNA polymerase II translocation." *Nature Structural & Molecular Biology*, 15(8), 811-818.
- Brutlag, D., Schekman, R., Kornberg, A. (1971). "A possible role for RNA polymerase in the initiation of M13 DNA synthesis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 68(11), 2826-2829.
- Buratowski, S. (2009). "Progression through the RNA polymerase II CTD cycle." *Molecular Cell*, 36(4), 541-546.
- Burgess, R. R., Travers, A. A., Dunn, J. J., Bautz, E. K. F. (1969). "Factor stimulating transcription by RNA polymerase." *Nature*, 221(5175), 43-46.
- Cermakian, N., Ikeda, T. M., Cedergren, R., Gray, M. W. (1996). "Sequences homologous to yeast mitochondrial and bacteriophage T3 and T7 RNA polymerases are widespread throughout the eukaryotic lineage." *Nucleic Acids Research*, 24(4), 648-654.
- Cermakian, N., Ikeda, T. M., Miramontes, P., Lang, B. F., Gray, M. W., Cedergren, R. (1997). "On the evolution of the single-subunit RNA polymerases." *Journal of Molecular Evolution*, 45(6), 671-681.
- Cong, Y. S., Yarrow, D., Li, Y. Y., Fukuhara, H. (1994). "Linear DNA plasmids from Pichia etchellsii, Debaryomyces hansenii and Wingea robertsiae." *Microbiology*, 140 (Pt 6), 1327-1335.
- Cramer, P. (2002). "Multisubunit RNA polymerases." *Current Opinion in Structural Biology*, 12(1), 89-97.
- Cramer, P., Bushnell, D. A., Fu, J., Gnatt, A. L., Maier-Davis, B., Thompson, N. E., Burgess, R. R., Edwards, A. M., David, P. R., Kornberg, R. D. (2000). "Architecture of RNA polymerase II and implications for the transcription mechanism." *Science*, 288(5466), 640-649.
- Cramer, P., Bushnell, D. A., Kornberg, R. D. (2001). "Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 angstrom resolution." *Science*, 292(5523), 1863-1876.
- Crute, J. J., Tsurumi, T., Zhu, L., Weller, S. K., Olivo, P. D., Challberg, M. D., Mocarski, E. S., Lehman, I. R. (1989). "Herpes simplex virus 1 helicase-primase: a complex of three herpes-encoded gene products." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(7), 2186-2189.

- Epshtein, V., Mustaev, A., Markovtsov, V., Bereshchenko, O., Nikiforov, V., Goldfarb, A. (2002). "Swing-gate model of nucleotide entry into the RNA polymerase active center." *Molecular Cell*, 10(3), 623-634.
- Erie, D. A., Kennedy, S. R. (2009). "Forks, pincers, and triggers: the tools for nucleotide incorporation and translocation in multi-subunit RNA polymerases." *Current Opinion in Structural Biology*, 19(6), 708-714.
- Feng, G. H., Lee, D. N., Wang, D., Chan, C. L., Landick, R. (1994). "GreA-induced transcript cleavage in transcription complexes containing Escherichia coli RNA polymerase is controlled by multiple factors, including nascent transcript location and structure." *Journal of Biological Chemistry*, 269(35), 22282-22294.
- Foster, J. E., Holmes, S. F., Erie, D. A. (2001). "Allosteric binding of nucleoside triphosphates to RNA polymerase regulates transcription elongation." *Cell*, 106(2), 243-252.
- Fu, T. B., Taylor, J. (1993). "The RNAs of hepatitis delta virus are copied by RNA polymerase II in nuclear homogenates." *Journal of Virology*, 67(12), 6965-6972.
- Furth, J. J., Hurwitz, J., Anders, M. (1962). "The role of deoxyribonucleic acid in ribonucleic acid synthesis. I. The purification and properties of ribonucleic acid polymerase." *Journal of Biological Chemistry*, 237, 2611-2619.
- Gnatt, A. L., Cramer, P., Fu, J., Bushnell, D. A., Kornberg, R. D. (2001). "Structural basis of transcription: an RNA polymerase II elongation complex at 3.3 Å resolution." *Science*, 292(5523), 1876-1882.
- Gong, X. Q., Zhang, C., Feig, M., Burton, Z. F. (2005). "Dynamic error correction and regulation of downstream bubble opening by human RNA polymerase II." *Molecular Cell*, 18(4), 461-470.
- Gross, C. A., Chan, C., Dombroski, A., Gruber, T., Sharp, M., Tupy, J., Young, B. (1998). "The functional and regulatory roles of sigma factors in transcription." *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 63, 141-155.
- Grunberg-Manago, M., Oritz, P. J., Ochoa, S. (1955). "Enzymatic synthesis of nucleic acidlike polynucleotides." *Science*, 122(3176), 907-910.
- Guarino, L. A., Xu, B., Jin, J., Dong, W. (1998). "A virus-encoded RNA polymerase purified from baculovirus-infected cells." *Journal of Virology*, 72(10), 7985-7991.
- Guo, Q., Sousa, R. (2006). "Translocation by T7 RNA polymerase: a sensitively poised Brownian ratchet." *Journal of Molecular Biology*, 358(1), 241-254.
- Hahn, M. Y., Bae, J. B., Park, J. H., Roe, J. H. (2003). "Isolation and characterization of Streptomyces coelicolor RNA polymerase, its sigma, and antisigma factors." *Methods in Enzymology*, 370, 73-82.
- Hajdukiewicz, P. T., Allison, L. A., Maliga, P. (1997). "The two RNA polymerases encoded by the nuclear and the plastid compartments transcribe distinct groups of genes in tobacco plastids." *EMBO Journal*, 16(13), 4041-4048.
- Herr, A. J., Jensen, M. B., Dalmay, T., Baulcombe, D. C. (2005). "RNA polymerase IV directs silencing of endogenous DNA." *Science*, 308(5718), 118-120.
- Hertveldt, K., Lavigne, R., Pleteneva, E., Sernova, N., Kurochkina, L., Korchevskii, R., Robben, J., Mesyanzhinov, V., Krylov, V. N., Volckaert, G. (2005). "Genome comparison of Pseudomonas aeruginosa large phages." *Journal of Molecular Biology*, 354(3), 536-545.
- Himmelreich, R., Hilbert, H., Plagens, H., Pirkel, E., Li, B. C., Herrmann, R. (1996). "Complete sequence analysis of the genome of the bacterium Mycoplasma pneumoniae." *Nucleic Acids Research*, 24(22), 4420-4449.
- Hishinuma, F., Hirai, K. (1991). "Genome organization of the linear plasmid, pSKL, isolated from Saccharomyces kluyveri." *Molecular and General Genetics*, 226(1-2), 97-106.
- Holmes, S. F., Erie, D. A. (2003). "Downstream DNA sequence effects on transcription elongation. Allosteric binding of nucleoside triphosphates facilitates translocation via a ratchet motion." *Journal of Biological Chemistry*, 278(37), 35597-35608.
- Howe, C. J. (1992). "Plastid origin of an extrachromosomal DNA molecule from Plasmodium, the causative agent of malaria." *Journal of Theoretical Biology*, 158(2), 199-205.

- Cheung, A. C., Cramer, P.** (2011). "Structural basis of RNA polymerase II backtracking, arrest and reactivation." *Nature*, 471(7337), 249-253.
- Iyer, L. M., Balaji, S., Koonin, E. V., Aravind, L.** (2006). "Evolutionary genomics of nucleocytoplasmic large DNA viruses." *Virus Research*, 117(1), 156-184.
- Iyer, L. M., Koonin, E. V., Aravind, L.** (2003). "Evolutionary connection between the catalytic subunits of DNA-dependent RNA polymerases and eukaryotic RNA-dependent RNA polymerases and the origin of RNA polymerases." *BMC Structural Biology*, 3, 1.
- Iyer, L. M., Koonin, E. V., Leipe, D. D., Aravind, L.** (2005). "Origin and evolution of the archaeo-eukaryotic primase superfamily and related palm-domain proteins: structural insights and new members." *Nucleic Acids Research*, 33(12), 3875-3896.
- Johnson, R. S., Strausbauch, M., Cooper, R., Register, J. K.** (2008). "Rapid kinetic analysis of transcription elongation by Escherichia coli RNA polymerase." *Journal of Molecular Biology*, 381(5), 1106-1113.
- Kashkina, E., Anikin, M., Brueckner, F., Lehmann, E., Kochetkov, S. N., McAllister, W. T., Cramer, P., Temiakov, D.** (2007). "Multisubunit RNA polymerases melt only a single DNA base pair downstream of the active site." *Journal of Biological Chemistry*, 282(30), 21578-21582.
- Kashkina, E., Anikin, M., Brueckner, F., Pomerantz, R. T., McAllister, W. T., Cramer, P., Temiakov, D.** (2006). "Template misalignment in multisubunit RNA polymerases and transcription fidelity." *Molecular Cell*, 24(2), 257-266.
- Kates, J. R., McAuslan, B. R.** (1967). "Poxvirus DNA-dependent RNA polymerase." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 58(1), 134-141.
- Kempken, F., Hermanns, J., Osiewacz, H. D.** (1992). "Evolution of linear plasmids." *Journal of Molecular Evolution*, 35(6), 502-513.
- Kennedy, S. R., Erie, D. A.** (2011). "Templated nucleoside triphosphate binding to a noncatalytic site on RNA polymerase regulates transcription." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(15), 6079-6084.
- Kettenberger, H., Armache, K. J., Cramer, P.** (2004). "Complete RNA polymerase II elongation complex structure and its interactions with NTP and TFIIS." *Molecular Cell*, 16(6), 955-965.
- Kireeva, M., Nedialkov, Y. A., Gong, X. Q., Zhang, C., Xiong, Y., Moon, W., Burton, Z. F., Kashlev, M.** (2009). "Millisecond phase kinetic analysis of elongation catalyzed by human, yeast, and Escherichia coli RNA polymerase." *Methods*, 48(4), 333-345.
- Kireeva, M. L., Nedialkov, Y. A., Cremona, G. H., Purtov, Y. A., Lubkowska, L., Malagon, F., Burton, Z. F., Strathern, J. N., Kashlev, M.** (2008). "Transient reversal of RNA polymerase II active site closing controls fidelity of transcription elongation." *Molecular Cell*, 30(5), 557-566.
- Komissarova, N., Kashlev, M.** (1997). "RNA polymerase switches between inactivated and activated states By translocating back and forth along the DNA and the RNA." *Journal of Biological Chemistry*, 272(24), 15329-15338.
- Korzheva, N., Mustaev, A., Kozlov, M., Malhotra, A., Nikiforov, V., Goldfarb, A., Darst, S. A.** (2000). "A structural model of transcription elongation." *Science*, 289(5479), 619-625.
- Kresge, N., Simoni, R. D., Hill, R. L.** (2006). "The discovery and isolation of RNA polymerase by Jerard Hurwitz." *Journal of Biological Chemistry*, 281(15).
- Kuznar, J., Salas, M. L., Vinuela, E.** (1980). "DNA-dependent RNA polymerase in African swine fever virus." *Virology*, 101(1), 169-175.
- Kuznedelov, K., Korzheva, N., Mustaev, A., Severinov, K.** (2002). "Structure-based analysis of RNA polymerase function: the largest subunit's rudder contributes critically to elongation complex stability and is not involved in the maintenance of RNA-DNA hybrid length." *EMBO Journal*, 21(6), 1369-1378.
- Landick, R.** (2009). "Functional divergence in the growing family of RNA polymerases." *Structure*, 17(3), 323-325.
- Lane, W. J., Darst, S. A.** (2010). "Molecular evolution of multisubunit RNA polymerases: sequence analysis." *Journal of Molecular Biology*, 395(4), 671-685.

- Lang, B. F., Burger, G., Okelly, C. J., Cedergren, R., Golding, G. B., Lemieux, C., Sankoff, D., Turmel, M., Gray, M. W. (1997). "An ancestral mitochondrial DNA resembling a eubacterial genome in miniature." *Nature*, 387(6632), 493-497.
- Lanka, E., Scherzinger, E., Gunther, E., Schuster, H. (1979). "A DNA primase specified by I-like plasmids." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(8), 3632-3636.
- Lewis, D. E., Komissarova, N., Le, P., Kashlev, M., Adhya, S. (2008). "DNA sequences in gal operon override transcription elongation blocks." *Journal of Molecular Biology*, 382(4), 843-858.
- Luo, J., Hall, B. D. (2007). "A multistep process gave rise to RNA polymerase IV of land plants." *Journal of Molecular Evolution*, 64(1), 101-112.
- Marcussen, T., Oxelman, B., Skog, A., Jakobsen, K. S. (2010). "Evolution of plant RNA polymerase IV/V genes: evidence of subneofunctionalization of duplicated NRPD2/NRPE2-like paralogs in *Viola* (Violaceae)." *BMC Evolutionary Biology*, 10, 45.
- Masters, B. S., Stohl, L. L., Clayton, D. A. (1987). "Yeast mitochondrial RNA polymerase is homologous to those encoded by bacteriophages T3 and T7." *Cell*, 51(1), 89-99.
- McAllister, W. T. (1993). "Structure and function of the bacteriophage T7 RNA polymerase (or, the virtues of simplicity)." *Cellular and Molecular Biology Research*, 39(4), 385-391.
- Minakhin, L., Bhagat, S., Brunning, A., Campbell, E. A., Darst, S. A., Ebright, R. H., Severinov, K. (2001). "Bacterial RNA polymerase subunit omega and eukaryotic RNA polymerase subunit RPB6 are sequence, structural, and functional homologs and promote RNA polymerase assembly." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(3), 892-897.
- Miropolskaya, N., Artsimovitch, I., Klimasauskas, S., Nikiforov, V., Kulbachinskiy, A. (2009). "Allosteric control of catalysis by the F loop of RNA polymerase." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(45), 18942-18947.
- Naji, S., Bertero, M. G., Spitalny, P., Cramer, P., Thomm, M. (2008). "Structure-function analysis of the RNA polymerase cleft loops elucidates initial transcription, DNA unwinding and RNA displacement." *Nucleic Acids Research*, 36(2), 676-687.
- Naryshkina, T., Kuznedelov, K., Severinov, K. (2006). "The role of the largest RNA polymerase subunit lid element in preventing the formation of extended RNA-DNA hybrid." *Journal of Molecular Biology*, 361(4), 634-643.
- Nedialkov, Y. A., Gong, X. Q., Hovde, S. L., Yamaguchi, Y., Handa, H., Geiger, J. H., Yan, H., Burton, Z. F. (2003). "NTP-driven translocation by human RNA polymerase II." *Journal of Biological Chemistry*, 278(20), 18303-18312.
- Nechaev, S., Adelman, K. (2011). "Pol II waiting in the starting gates: Regulating the transition from transcription initiation into productive elongation." *Biochimica et Biophysica Acta*, 1809(1), 34-45.
- Nossal, N. G. (1980). "RNA priming of DNA replication by bacteriophage T4 proteins." *Journal of Biological Chemistry*, 255(5), 2176-2182.
- Nudler, E. (2009). "RNA polymerase active center: the molecular engine of transcription." *Annual Review of Biochemistry*, 78, 335-361.
- Nudler, E., Avetisova, E., Markovtsov, V., Goldfarb, A. (1996). "Transcription processivity: protein-DNA interactions holding together the elongation complex." *Science*, 273(5272), 211-217.
- Nudler, E., Mustaev, A., Lukhtanov, E., Goldfarb, A. (1997). "The RNA-DNA hybrid maintains the register of transcription by preventing backtracking of RNA polymerase." *Cell*, 89(1), 33-41.
- Pokholok, D. K., Hannett, N. M., Young, R. A. (2002). "Exchange of RNA polymerase II initiation and elongation factors during gene expression in vivo." *Molecular Cell*, 9(4), 799-809.
- Rackwitz, H. R., Rohde, W., Sanger, H. L. (1981). "DNA-dependent RNA polymerase II of plant origin transcribes viroid RNA into full-length copies." *Nature*, 291(5813), 297-301.
- Raoult, D., Audic, S., Robert, C., Abergel, C., Renesto, P., Ogata, H., La Scola, B., Suzan, M., Claverie, J. M. (2004). "The 1.2-megabase genome sequence of Mimivirus." *Science*, 306(5700), 1344-1350.

- Ream, T. S., Haag, J. R., Wierzbicki, A. T., Nicora, C. D., Norbeck, A. D., Zhu, J. K., Hagen, G., Guilfoyle, T. J., Pasa-Tolic, L., Pikaard, C. S. (2009). "Subunit compositions of the RNA-silencing enzymes Pol IV and Pol V reveal their origins as specialized forms of RNA polymerase II." *Molecular Cell*, 33(2), 192-203.
- Revyakin, A., Liu, C., Ebright, R. H., Strick, T. R. (2006). "Abortive initiation and productive initiation by RNA polymerase involve DNA scrunching." *Science*, 314(5802), 1139-1143.
- Rowen, L., Kornberg, A. (1978). "Primase, the dnaG protein of Escherichia coli. An enzyme which starts DNA chains." *Journal of Biological Chemistry*, 253(3), 758-764.
- Rozovskaya, T. A., Chenchik, A. A., Bibilashvili, R. S. (1981). "Pyrophosphorolytic reaction catalyzed by Escherichia-coli RNA-polymerase." *Molecular Biology*, 15(3), 498-510.
- Rudd, M. D., Izban, M. G., Luse, D. S. (1994). "The active site of RNA polymerase II participates in transcript cleavage within arrested ternary complexes." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(17), 8057-8061.
- Ruprich-Robert, G., Thuriaux, P. (2010). "Non-canonical DNA transcription enzymes and the conservation of two-barrel RNA polymerases." *Nucleic Acids Research*, 38(14), 4559-4569.
- Schaffrath, R., Soond, S. M., Meacock, P. A. (1995). "Cytoplasmic gene expression in yeast: a plasmid-encoded transcription system in Kluyveromyces lactis." *Biochemical Society Transactions*, 23(1), 128S.
- ex Schaffrath, R., Meinhardt, F., Meacock, P. A. (1997). "ORF7 of yeast plasmid pGKL2: analysis of gene expression in vivo." *Current Genetics*, 31(2), 190-192.
- Scherzinger, E., Lanka, E., Hillenbrand, G. (1977). "Role of bacteriophage T7 DNA primase in the initiation of DNA strand synthesis." *Nucleic Acids Research*, 4(12), 4151-4163.
- Schnitzler, P., Sonntag, K. C., Muller, M., Janssen, W., Bugert, J. J., Koonin, E. V., Darai, G. (1994). "Insect iridescent virus type 6 encodes a polypeptide related to the largest subunit of eukaryotic RNA polymerase II." *Journal of General Virology*, 75, 1557-1567.
- Sidorenkov, I., Komissarova, N., Kashlev, M. (1998). "Crucial role of the RNA:DNA hybrid in the processivity of transcription." *Molecular Cell*, 2(1), 55-64.
- Sosunov, V., Sosunova, E., Mustaev, A., Bass, I., Nikiforov, V., Goldfarb, A. (2003). "Unified two-metal mechanism of RNA synthesis and degradation by RNA polymerase." *EMBO Journal*, 22(9), 2234-2244.
- Sousa, R., Chung, Y. J., Rose, J. P., Wang, B. C. (1993). "Crystal structure of bacteriophage T7 RNA polymerase at 3.3 Å resolution." *Nature*, 364(6438), 593-599.
- Steitz, T. A. (1998). "Structural biology - A mechanism for all polymerases." *Nature*, 391(6664), 231-232.
- Sugiura, C., Kobayashi, Y., Aoki, S., Sugita, C., Sugita, M. (2003). "Complete chloroplast DNA sequence of the moss Physcomitrella patens: evidence for the loss and relocation of rpoA from the chloroplast to the nucleus." *Nucleic Acids Research*, 31(18), 5324-5331.
- Sweetser, D., Nonet, M., Young, R. A. (1987). "Prokaryotic and eukaryotic RNA polymerases have homologous core subunits." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(5), 1192-1196.
- Sydow, J. F., Brueckner, F., Cheung, A. C., Damsma, G. E., Dengl, S., Lehmann, E., Vassilyev, D., Cramer, P. (2009). "Structural basis of transcription: mismatch-specific fidelity mechanisms and paused RNA polymerase II with frayed RNA." *Molecular Cell*, 34(6), 710-721.
- Tan, L., Wiesler, S., Trzaska, D., Carney, H. C., Weinzierl, R. O. (2008). "Bridge helix and trigger loop perturbations generate superactive RNA polymerases." *Journal of Biology*, 7(10), 40.
- Thomas, J. A., Rolando, M. R., Carroll, C. A., Shen, P. S., Belnap, D. M., Weintraub, S. T., Serwer, P., Hardies, S. C. (2008). "Characterization of Pseudomonas chlororaphis myovirus 201varphi2-1 via genomic sequencing, mass spectrometry, and electron microscopy." *Virology*, 376(2), 330-338.
- Tornaletti, S., Hanawalt, P. C. (1999). "Effect of DNA lesions on transcription elongation." *Biochimie*, 81(1-2), 139-146.

- Touloukhonov, I., Zhang, J., Palangat, M., Landick, R. (2007). "A central role of the RNA polymerase trigger loop in active-site rearrangement during transcriptional pausing." *Molecular Cell*, 27(3), 406-419.
- Travers, A. A., Burgess, R. R. (1969). "Cyclic re-use of the RNA Polymerase sigma factor." *Nature*, 222(5193), 537-540.
- van der Vliet, P. C., Levine, A. J. (1973). "DNA-binding proteins specific for cells infected by adenovirus." *Nature - New Biology*, 246(154), 170-174.
- Vassilyev, D. G., Sekine, S., Laptenko, O., Lee, J., Vassilyeva, M. N., Borukhov, S., Yokoyama, S. (2002). "Crystal structure of a bacterial RNA polymerase holoenzyme at 2.6 Å resolution." *Nature*, 417(6890), 712-719.
- Vassilyev, D. G., Vassilyeva, M. N., Perederina, A., Tahirov, T. H., Artsimovitch, I. (2007a). "Structural basis for transcription elongation by bacterial RNA polymerase." *Nature*, 448(7150), 157-162.
- Vassilyev, D. G., Vassilyeva, M. N., Zhang, J. W., Palangat, M., Artsimovitch, I., Landick, R. (2007b). "Structural basis for substrate loading in bacterial RNA polymerase." *Nature*, 448(7150), 163-168.
- Via, A., Ferre, F., Brannetti, B., Valencia, A., Helmer-Citterich, M. (2000). "Three-dimensional view of the surface motif associated with the P-loop structure: cis and trans cases of convergent evolution." *Journal of Molecular Biology*, 303(4), 455-465.
- Wang, D., Bushnell, D. A., Huang, X., Westover, K. D., Levitt, M., Kornberg, R. D. (2009). "Structural basis of transcription: backtracked RNA polymerase II at 3.4 angstrom resolution." *Science*, 324(5931), 1203-1206.
- Wang, D., Bushnell, D. A., Westover, K. D., Kaplan, C. D., Kornberg, R. D. (2006). "Structural basis of transcription: role of the trigger loop in substrate specificity and catalysis." *Cell*, 127(5), 941-954.
- Wang, M. D., Schnitzer, M. J., Yin, H., Landick, R., Gelles, J., Block, S. M. (1998). "Force and velocity measured for single molecules of RNA polymerase." *Science*, 282(5390), 902-907.
- Wang, Y., Jehle, J. A. (2009). "Nudiviruses and other large, double-stranded circular DNA viruses of invertebrates: new insights on an old topic." *Journal of Invertebrate Pathology*, 101(3), 187-193.
- Webb, E. C. (1992). *Enzyme nomenclature 1992 : recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the nomenclature and classification of enzymes*, San Diego; Sydney: Published for the International Union of Biochemistry and Molecular Biology by Academic Press.
- Weinzierl, R. O. (2010). "The nucleotide addition cycle of RNA polymerase is controlled by two molecular hinges in the Bridge Helix domain." *BMC Biology*, 8, 134.
- Werner, F., Grohmann, D. (2011). "Evolution of multisubunit RNA polymerases in the three domains of life." *Nature Reviews Microbiology*, 9(2), 85-98.
- Westover, K. D., Bushnell, D. A., Kornberg, R. D. (2004a). "Structural basis of transcription: nucleotide selection by rotation in the RNA polymerase II active center." *Cell*, 119(4), 481-489.
- Westover, K. D., Bushnell, D. A., Kornberg, R. D. (2004b). "Structural basis of transcription: separation of RNA from DNA by RNA polymerase II." *Science*, 303(5660), 1014-1016.
- Wierzbicki, A. T., Ream, T. S., Haag, J. R., Pikaard, C. S. (2009). "RNA polymerase V transcription guides ARGONAUTE4 to chromatin." *Nature Genetics*, 41(5), 630-634.
- Wilson, D. W., Meacock, P. A. (1988). "Extranuclear gene expression in yeast: evidence for a plasmid-encoded RNA polymerase of unique structure." *Nucleic Acids Res*, 16(16), 8097-8112.
- Wilson, W. H., Schroeder, D. C., Allen, M. J., Holden, M. T., Parkhill, J., Barrell, B. G., Churcher, C., Hamlin, N., Mungall, K., Norbertczak, H., Quail, M. A., Price, C., Rabinowitsch, E., Walker, D., Craigon, M., Roy, D., Ghazal, P. (2005). "Complete genome sequence and lytic phase transcription profile of a Coccolithovirus." *Science*, 309(5737), 1090-1092.
- Worsham, P. L., Bolen, P. L. (1990). "Killer toxin production in *Pichia acaciae* is associated with linear DNA plasmids." *Current Genetics*, 18(1), 77-80.

- Xu, B. J., Clayton, D. A.** (1996). "RNA-DNA hybrid formation at the human mitochondrial heavy-strand origin ceases at replication start sites: An implication for RNA-DNA hybrids serving as primers." *EMBO Journal*, 15(12), 3135-3143.
- Yin, Y. W., Steitz, T. A.** (2004). "The structural mechanism of translocation and helicase activity in T7 RNA polymerase." *Cell*, 116(3), 393-404.
- Zakharova, N., Paster, B. J., Wesley, I., Dewhirst, F. E., Berg, D. E., Severinov, K. V.** (1999). "Fused and overlapping rpoB and rpoC genes in Helicobacters, Campylobacters, and related bacteria." *Journal of Bacteriology*, 181(12), 3857-3859.
- Zaychikov, E., Martin, E., Denissova, L., Kozlov, M., Markovtsov, V., Kashlev, M., Heumann, H., Nikiforov, V., Goldfarb, A., Mustaev, A.** (1996). "Mapping of catalytic residues in the RNA polymerase active center." *Science*, 273(5271), 107-109.
- Zenkin, N., Yuzenkova, Y., Severinov, K.** (2006). "Transcript-assisted transcriptional proofreading." *Science*, 313(5786), 518-520.
- Zhang, G., Campbell, E. A., Minakhin, L., Richter, C., Severinov, K., Darst, S. A.** (1999). "Crystal structure of *Thermus aquaticus* core RNA polymerase at 3.3 Å resolution." *Cell*, 98(6), 811-824.
- Zhang, J., Palangat, M., Landick, R.** (2010). "Role of the RNA polymerase trigger loop in catalysis and pausing." *Nature Structural & Molecular Biology*, 17(1), 99-104.

Internetové zdroje

- Brenda** (2011). "DNA-directed RNA polymerase." *Enzyme database – BRENDA*, 10. únor 2011, 17:01 UTC. <http://www.brenda-enzymes.org/php/result_flat.php4?ecno=2.7.7.6>
- Wikipedia contributors** (2011). "T7 RNA polymerase." *Wikipedia, The Free Encyclopedia*, 19. únor 2011, 12:41 UTC. <http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=T7_RNA_polymerase&oldid=414773998>